

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis de los homólogos nucleares de MFP1 en A cepa :  
caracterización, presencia en distintos tipos celulares y  
posible funcionalidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Rafael Samaniego García**

DIRECTOR:

**Susana Moreno Díaz de la Espina**

**Madrid, 2015**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

***Análisis de los homólogos nucleares de MFP1 en A. cepa:  
caracterización, presencia en distintos tipos celulares  
y posible funcionalidad***

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología por la U.C.M.  
presentada por

**RAFAEL SAMANIEGO GARCÍA**

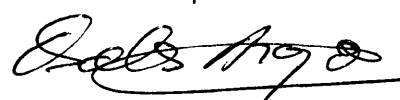


VºBº de la Directora



Dra. Susana Moreno  
Díaz de la Espina

VºBº de la Tutora del Departamento



Dra. Dolores Aragonés Sanz

**Madrid, junio de 2004**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Susana Moreno Díaz de la Espina la dirección de esta Tesis Doctoral.

Agradezco también a las Dras. Iris Meier, Consuelo de la Torre y al Dr. Rafael Giraldo el haber puesto a mi disposición sus laboratorios y su experiencia en los experimentos de clonación y fosforilación de MFP1, sincronización celular, e inmunoprecipitación, respectivamente.

Así como la colaboración de mi tutora en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, la Dra. Dolores Aragonés.

Agradezco a los servicios del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), y a sus responsables técnicos, su excelente trabajo y profesionalidad: M<sup>a</sup> Ángeles Ollacarizqueta (microscopía confocal), M<sup>a</sup> Dolores Guirao y Jasminka Boscovick (microscopía electrónica), Pedro Lastres (citometría de flujo), Ramón Toro y Mario García (informática), así como a Diego Megía del servicio de Microscopía Confocal de la Facultad de Medicina de la UAM, y a Matoya Lafita (secretaría).

Ha sido un verdadero placer trabajar todos estos años con Mercedes Carnota y José Luis Marcilla, muchos de los resultados de esta Tesis se han conseguido gracias a su esfuerzo y colaboración.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio de Matriz Nuclear del Centro de Investigaciones Biológicas su inagotable ayuda y colaboración: Fernando Novillo, Wendou Yu, Nieves Fontúrbel, M<sup>a</sup> del Mar Robles, Elsa Alverca, Hua Li, Ping Cui, Verónica Domínguez y Adriana Černa, así como a Ricardo Acevedo, Eida González, M<sup>a</sup> Encarnación Fernández, Gerardo Vázquez-Nin y Olga Echeverría.

También debo incluir a mis compañeros del Departamento de Plantas y de otros departamentos o centros por su colaboración: Fernando González, Victoria Rodríguez, David López, Isabel Matía; M<sup>a</sup> José Coronado; Myriam Molina, Israel Pagán, Gema Vila; Ismael Sánchez, Marta de la Poza, Gema Pérez, Beatriz Beroiz,

Mercedes Mendoza, Cristina Magaña, M<sup>a</sup> Luisa Ruíz, Pedro Hernández; M<sup>a</sup> José Tobajas; Dolores Bernardo; Teresa Díaz, Ana Muñoz; Jesús Carballo, Margarita Carrascosa; así como a Javier Medina, Félix Ortego, Concepción García, Rafa Escribano, y a todos los que por motivos de espacio me es imposible citar.

También agradezco sinceramente la calurosa acogida y colaboración a mis compañeros de laboratorio del *Plant Biotechnology Center* durante mi estancia en Ohio: Annkatrin Rose, Shalaka Patel, Tomasz Calikowsky y muy especialmente a Sun Yong Jeong y Louis Tang.

En este párrafo me gustaría además reconocer de manera especial mi más sincera admiración, tanto en lo científico como en lo personal, a Ricardo Acevedo, Elsa Alverca, Cristina Caballero y Mercedes Carnota.

Por supuesto, ha sido fundamental en estos años el apoyo, la paciencia y la comprensión de mi familia, especialmente mis padres, Óscar Blanco y el resto de mis amigos, y por supuesto de Laura. A ella y a mi hija Paula me gustaría dedicarles esta Tesis Doctoral.

También quiero dar las gracias al Dr. Michael J. Harvey de la Universidad de Wisconsin, por cedernos la genoteca de *Allium cepa*, y de nuevo a la Dra. Iris Meier por los sueros contra MFP1 utilizados.

Agradezco por último al Ministerio de Ciencia y Tecnología el haberme concedido una Beca de FPI asociada al proyecto DGICYT P98-0647 y una estancia de corta duración en *The Ohio State University* en Columbus, Ohio.

RESUMEN

---

MFP1 (*MAR-binding Filament-like Protein 1*) es una proteína con capacidad para unir regiones MARs (*Matrix Attachment Regions*) de ADN, y contiene un extenso dominio *coiled-coil*. Se conoce su secuencia completa en tomate, *Arabidopsis* y tabaco. Su secuencia está dividida en dos dominios principales, el más corto corresponde al extremo N-terminal de la proteína y contiene dos regiones hidrofóbicas y una señal de transición a cloroplastos. El resto de la secuencia la ocupa un largo dominio *coiled-coil*, donde se localizan una señal de localización nuclear y un subdominio de unión a ADN, con dos sitios de fosforilación para Caseína Kinasa CK2 con la capacidad de inhibir dicha unión.

Sueros específicos contra distintos dominios de MFP1 detectan esta proteína de 80 KDa en distintos tejidos y especies vegetales, indicando su conservación en plantas. Mediante técnicas de fraccionamiento celular y análisis de MFP1-GFP en células transfectadas, se ha detectado la proteína en los plastidios, y con cierta controversia en el núcleo y la matriz nuclear, que es la estructura nuclear no-cromatínica implicada en la organización del genoma y los distintos subdominios del núcleo. Se desconoce la función de MFP1, aunque basándose en sus potenciales características estructurales y su capacidad para unir ADN, se ha propuesto que podría ejercer un papel en la organización de los genomas del cloroplasto y el núcleo.

Estudios anteriores mediante un suero anti-LeMFP1 nos permitieron identificar dos proteínas nucleares antigénicamente relacionadas en *Allium cepa* de 80 y 90 KDa. La primera es una proteína nuclear soluble, mientras que la segunda forma parte de la matriz nuclear y se distribuye por los filamentos del nucleoesqueleto y en una nueva categoría de cuerpos nucleares.

En esta Tesis Doctoral se han caracterizado las dos proteínas nucleares de *Allium cepa* mediante inmunodetección e inmunoprecipitación con dos sueros anti-MFP1 desarrollados contra las proteínas de tomate y *Arabidopsis*. AcMFP1-78 KDa tiene un valor de pI experimental ligeramente ácido (5,5) y es inmunoprecipitada e inmunodetectada por ambos sueros. Es una proteína constitutiva, que se distribuye en distintos subdominios nucleares en función del

tipo celular y el tejido, como se ha demostrado mediante inmunofluorescencia con los mismos sueros. El análisis de microscopía electrónica ha demostrado que se distribuye por pequeños dominios localizados preferentemente en la periferia de las masas de heterocromatina densa. AcMFP1-78 KDa posee una doble localización subcelular, en el núcleo y en los cloroplastos, con un patrón de distribución similar al de MFP1 en otras especies.

*Allium cepa* posee una segunda proteína homóloga de 90 KDa y pl básico (8,5-9,5) con distintos estados de fosforilación de los que depende su unión a la matriz nuclear. Se ha demostrado que la Caseína Kinasa CK2 endógena está implicada en la regulación de dicha unión. AcMFP1-90 KDa se acumula en cuerpos nucleares cuya presencia en el núcleo está favorecida por la proliferación celular y la presencia de luz. También se distribuye por el retículo de la matriz nuclear, habiéndose detectado asociada a los filamentos del nucleoesqueleto.

Se ha comprobado mediante estudios de co-localización que las proteínas AcMFP1 no forman parte de los complejos de replicación del ADN ni de los de procesamiento co-transcripcional del ARN, ni tampoco parecen estar relacionadas con los procesos de maduración y almacenamiento de los factores de *splicing* en los gránulos intercromatínicos o los cuerpos de Cajal. Las distintas características y patrones de distribución y expresión de ambas proteínas AcMFP1 sugieren funciones diferentes, o al menos formas distintas de regulación. El conjunto de los resultados sugiere una interacción de AcMFP1-78 KDa con la cromatina descondensada, así como una función estructural para AcMFP1-90 KDa en la matriz nuclear.

## ÍNDICE

---

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
Organización del genoma en el núcleo eucariota.....	13
Organización de los distintos subdominios nucleares .....	17
La Matriz Nuclear.....	21
Dinámica de las proteínas nucleares .....	23
Proteínas coiled-coil y Filamentos Intermedios .....	25
Proteínas relacionadas con la matriz nuclear de plantas .....	26
MFP1 ( <i>MAR-binding Filament-like Protein 1</i> ) .....	27
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>I. MATERIAL .....</b>	<b>32</b>
<b>1. Especies .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Cultivos.....</b>	<b>32</b>
2.1. Cultivos de cebolla .....	32
2.2.1. Cultivos sincronizados de cebolla .....	33
2.2. Cultivo de tabaco, tomate y <i>Arabidopsis</i> .....	33
<b>3. Anticuerpos.....</b>	<b>34</b>
<b>II. MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>1. Fraccionamiento celular.....</b>	<b>35</b>
1.1. Aislamiento de núcleos.....	35
1.2. Extracción de matrices nucleares mediante alta fuerza iónica .....	36



1.3.Extracción de matrices nucleares mediante el método de LIS .....	38
<b>2. Análisis de proteínas .....</b>	<b>38</b>
2.1. Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE).....	38
2.1.1. Preparación de muestras.....	39
2.1.2. Desnaturalización de proteínas.....	39
2.1.3. Valoración de proteínas .....	40
2.1.4. Desarrollo de la electroforesis.....	40
2.2. Electroforesis bidimensional .....	41
2.2.1. Doble solubilización de muestras de núcleos y MN para electroforesis bidimensional.....	41
2.2.2. Isoelectroenfoque (IEF) o primera dimensión .....	42
2.3. SDS-PAGE (segunda dimensión) .....	42
2.4. Electrotransferencia .....	43
2.5. Inmunodetección en membrana.....	43
2.6. Tinción de geles con azul de Coomassie .....	44
2.7. Tinción de geles con plata .....	45
2.8. Inmunoprecipitación de proteínas .....	45
<b>3. Ensayos de fosforilación.....</b>	<b>46</b>
3.1. Defosforilación <i>in vitro</i> de la fracción F2 con Fosfatasa Alcalina...	46
3.2. Fosforilación de la matriz nuclear con Caseína Kinasa CK2 .....	47
3.3. Inhibición / estimulación de CK2 endógena .....	47
3.3.1. Inhibición de la CK2.....	47
3.3.2. Estimulación de CK2.....	48
3.4. Análisis estadístico .....	48
<b>4. Inmunofluorescencia (IF) .....</b>	<b>48</b>
4.1. Núcleos aislados y fracciones subnucleares.....	48
4.1.1. Preparación de las muestras .....	49
4.1.2. Reacción en suspensión .....	49
4.2. Células enteras .....	50
4.2.1. Preparación de muestras de aplastados celulares.....	50
4.2.2. Reacción inmunológica.....	51
4.3. Observación, controles y análisis estadístico .....	52
<b>5. Localización de proteínas mediante inmunomarcado con oro y</b>	

<b>microscopía electrónica convencional.....</b>	<b>53</b>
5.1. Preparación de las muestras .....	53
5.1.1. Fijación.....	53
5.1.2. Deshidratación, infiltración e inclusión en LR White.....	53
5.1.3. Ultramicrotomía .....	54
5.2. Inmunomarcado con oro .....	55
<b>6. Citometría de flujo.....</b>	<b>56</b>
<b>7. Clonación de AcMFP1 a partir de una genoteca de cDNA</b>	
<b>de A. cepa .....</b>	<b>57</b>
7.1. Rastreo de la genoteca mediante PCR .....	57
7.1.1. Selección de los cebadores específicos.....	57
7.1.2. PCR y clonación de fragmentos amplificados .....	58
7.2. Hibridación de colonias con sondas de cDNA de MFP1 .....	59
7.2.1. Preparación de las sondas .....	59
7.2.2. Hibridación sobre colonias (Southern) .....	59
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>1. Caracterización de las proteínas reconocidas por los sueros</b>	
<b>anti-MFP1 en células proliferantes de raíz de Allium cepa .....</b>	<b>61</b>
1.1. Caracterización mediante inmunodetección en membrana .....	61
1.1.1. Suero anti-MFP1 de tomate (288).....	61
1.1.2. Suero anti-MFP1 de Arabidopsis (91).....	63
1.2. Inmuoprecipitación mediante los sueros 288 y 91 .....	64
1.3. Asociación de la proteína de 90 KDa a la matriz nuclear.....	66
1.3.1. Efecto de la defosforilación con Fosfata Alcalina.....	67
1.3.2. Efecto de la fosforilación con Caseína Kinasa CK2 .....	68
1.3.3. Efecto de la estimulación de la CK2 endógena .....	71
1.3.4. Efecto de la inhibición de la CK2 endógena.....	72
1.3.5. Estudio de la proteína de 90 KDa en geles bidimensionales .....	73
1.3.6. Estudio de las proteínas de 78 KDa en geles bidimensionales ....	78
<b>2. Clonación de AcMFP1.....</b>	<b>79</b>
2.1. Rastreo de una genoteca de cDNA de cebolla	

mediante PCR.....	79
2.2. Rastreo de una genoteca de cDNA de cebolla mediante hibridación de colonias .....	85
<b>3. Expresión y localización topológica de las proteínas de 78 y 90 KDa en distintos tejidos y situación fisiológicas .....</b>	<b>88</b>
3.1. Núcleos de células proliferantes asincrónicas y sincronizadas durante el ciclo celular .....	88
3.1.1. Inmunofluorescencia y microscopía confocal .....	88
3.1.2. Inmunomarcado con oro y microscopía electrónica .....	99
3.2. Distribución de las proteínas en células meristemáticas durmientes.....	101
3.3. Expresión y distribución de las proteínas AcMFP1 en células diferenciadas de raíz .....	104
3.4. Expresión y distribución de las proteínas AcMFP1 en hoja .....	107
<b>4. Relación con otros dominios nucleares.....</b>	<b>112</b>
4.1. Dominios de <i>splicing</i> co-transcripcional y maduración de los snRNAs .....	112
4.2. Focos de replicación de ADN.....	114
4.2.1. Marcado con anti-5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) .....	116
4.2.2. Estudio de co-localización entre BrdU y AcMFP1 .....	118
<b>5. Distribución de MFP1 en distintas especies vegetales .....</b>	<b>119</b>
5.1. MFP1 en tomate .....	121
5.2. AtMFP1 en <i>Arabidopsis</i> y su <i>knockout</i> .....	123
5.3. NtMFP1 en tabaco y en plantas transformadas con <i>AtMFP1</i> .....	126
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>131</b>
<b>1. Identificación de dos proteínas homólogas de MFP1 en cebolla .....</b>	<b>131</b>
1.1. Especificidad de los sueros 288 y 91 e identificación de las proteínas AcMFP1 .....	131
1.2. Clonación de <i>AcMFP1</i> .....	134
<b>2. La asociación de AcMFP1-90 KDa a la matriz nuclear está regulada por fosforilación con Caseína Kinasa CK2 .....</b>	<b>136</b>

2.1. La CK2 regula la unión de AcMFP1-90 KDa a la MN .....	136
2.2. AcMFP1-90 KDa es la única proteína MFP1 con pl básico .....	140
<b>3. Expresión y localización de las proteínas AcMFP1 en distintos tejidos y tipos celulares de cebolla .....</b>	<b>142</b>
3.1. AcMFP1-78 KDa es una proteína constitutiva de cebolla.....	142
3.2. Localización subcelular de las isoformas de AcMFP1-78 KDa.....	143
3.3. AcMFP1-78 KDa posee una doble localización nuclear y cloroplástica, pero no co-localiza con el ADN condensado del nucleoide .....	146
3.4. AcMFP1-90 KDa no es una proteína constitutiva de cebolla.....	147
3.5. AcMFP1-90 KDa se localiza asociada al nucleoesqueleto y en una nueva categoría de cuerpos nucleares .....	148
<b>4. Implicaciones funcionales de AcMFP1 .....</b>	<b>151</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>158</b>
<b>APÉNDICE A.....</b>	<b>177</b>
<b>APÉNDICE B.....</b>	<b>183</b>

ABREVIATURAS

**2-DE:** Electroforesis bidimensional

**A:** Adenina

**ADN:** Ácido DesoxiriboNucleico

**ARN:** Ácido RiboNucleico

**BrdU:** 5-Bromo-2'-deoxiUridina

**BSA:** Seroalbúmina bovina

**C:** Citosina

**cDNA:** ADN complementario

**CENP-E:** Proteína centromérica E

**Cit:** Fracción citoplasmática

**CK2:** Caseína Kinasa 2

**COP1:** *Constitutively Photomorphogenic Protein 1*; proteína constitutiva fotomorfogénica 1

**CSK:** Tampón de citoesqueleto

**DAPI:** 4', 6-diamino-2-fenilindol

**DB:** *Digestion Buffer*; Tampón de digestión

**DNasa I:** Desoxirribonucleasa I

**D.O.:** Densidad Óptica

**DTT:** Ditiotreitól

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetracético

**FA:** Fosfatasa Alcalina

**FI:** Filamentos Intermedios

**FISH:** *Fluorescence in situ hybridisation*; hibridación *in situ* de fluorescencia

**G:** Guanina

**GA:** Glutaraldehído

**GFP:** *Green Fluorescence Protein*; proteína verde fluorescente

**h:** Hora

**IF:** Inmunofluorescencia

**IFA:** *Intermediate Filament Antigen*; antígeno de filamentos intermedios

**HU:** Hidroxiurea

**Kb:** Kilobase

**KDa:** Kilodalton

**LIS:** 3, 5- diiodosalicilato de litio

**M:** Molar

**MAR:** *Matrix Attachment Region*; región de unión a la matriz nuclear

**mA:** Miliamperio

**ME:** Microscopía Electrónica de transmisión

**MFP1:** *MAR-binding Filament-like Protein 1*

**min:** Minuto

**ml:** Mililitro

**MN:** Matriz Nuclear

**MN-LIS:** Matriz Nuclear obtenida mediante el método de LIS

**mM:** Milimolar

**Mr:** Movilidad relativa electroforética en gel de acrilamida

**N:** Núcleo

**NAC:** *Nuclear Acidic Coiled-coil proteins*; proteínas nucleares ácidas con dominios coiled-coil

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**NLS:** *Nuclear Localization Signal*; señal de localización nuclear

**nm /  $\mu\text{m}$ :** Nanometro / micrómetro

**No:** Nucleolo

**NuMA:** *Nuclear Mitotic Apparatus protein*

**pb:** Par de bases de nucleótidos

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PFA:** Paraformaldehído

**PMSF:** Fluoruro de fenil metil sulfonilo

**pl:** Punto Isoeléctrico

**RNasa:** Ribonucleasa

**RNP:** Ribonucleoproteína

**rpm:** Revoluciones por minuto

**S:** Fase de síntesis de ADN del ciclo celular

**SDS-PAGE:** Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de SDS

**sg:** segundos

**snRNA:** Ácido ribonucleico nuclear de pequeño tamaño

**T:** Timidina

**TCA:** Ácido Tricloro Acético

**TX-100:** Detergente no iónico Triton X-100

**U:** Unidades

**UBF:** *Upstream Binding Factor*

**V:** Voltio

**v/v:** volumen/volumen

**W:** Vatio

**Ø:** Diámetro medio



## INTRODUCCIÓN

**MFP1** (**MAR-binding Filament-like Protein 1**) es una proteína nuclear de plantas con un extenso dominio *coiled-coil*, dos regiones hidrofóbicas en el extremo amino terminal y un subdominio de unión a regiones de ADN organizadoras del genoma denominadas S/MAR (*Scaffold/Matrix Attachment Region*) (Harder *et al*, 2000; Meier *et al*, 1996). Se ha descrito un gen *MFP1* en tomate y *Arabidopsis*, y dos en tabaco, cuya conservación de secuencia es variable. MFP1 se localiza en núcleos y matrices nucleares aisladas, y recientemente se ha descrito también en plastidios de células de tabaco en suspensión (Jeong *et al*, 2003). Su funcionalidad exacta está todavía por determinar. Aunque está catalogada como una proteína *MAR-binding*, se ha propuesto recientemente que podría tener además un papel en la organización del ADN del cloroplasto (Jeong *et al*, 2003).

### **Organización del genoma en el núcleo eucariota**

El genoma eucariota presenta varios niveles de organización implicados en la expresión génica. El primero está constituido por la ordenación lineal de los genes y las secuencias reguladoras en la doble hélice de ADN, que proporcionan su potencial genético (van Driel *et al*, 2003). Actualmente, este nivel de organización está bastante bien establecido en plantas, ya que se han secuenciado los genomas completos o parciales de varias especies (*Arabidopsis*, maíz, arroz, trigo, tomate, etc: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Genome/PlantBlast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Genome/PlantBlast)). A partir de este nivel, la organización del ADN está determinada por proteínas. Consiste en la organización nucleosómica y supranucleosómica de la cromatina, que facilita su empaquetamiento, favorece la interacción entre elementos reguladores y los hace competentes para interaccionar con otros factores regulando la expresión génica (Jackson, 2003 a)

En el primer nivel de organización o nivel de secuencia, el propio ADN experimenta modificaciones, produciéndose silenciamiento génico al metilarse los pares CG (Steimer *et al*, 2004; Johnson *et al*, 2002). La expresión de un gen o grupo de genes puede estar controlada también por elementos reguladores

como los *enhancers*, que aumentan la tasa de transcripción de determinados promotores desde posiciones incluso físicamente alejadas, aunque son susceptibles al efecto silenciador de la cromatina adyacente (Brown, 2003). Los *insulators* o elementos delimitantes aíslan un gen o grupo de genes del efecto de un *enhancer* al situarse entre ambos, participando además en la re-localización de los dominios cromatínicos por distintos dominios del núcleo (Kuhn y Geyer, 2003; Laat y Grosveld, 2003; en plantas Chua *et al*, 2003).

El segundo nivel de organización se corresponde con la cromatina, que es un complejo macromolecular de ADN y un número considerable de proteínas asociadas como las histonas y diversas proteínas estructurales y reguladoras (Belmont, 2003; Vermaak *et al*, 2003; Heslop-Harrison, 2000). El ADN lineal interacciona con las histonas centrales del nucleosoma formando fibras de ADN nucleosómico, y con la histona H1 produciendo empaquetamientos supranucleosómicos (Haushalter y Kadonaga, 2003). El ADN puede adoptar dos estados fundamentales de empaquetamiento, que originan a su vez dos estados funcionales en la cromatina: el transcripcionalmente activo o **descondensado**, y el estado transcripcionalmente inactivo, silenciado o **condensado** (Fig 1) (Lawrence *et al*, 2004). Ambos están determinados por su interacción con diversas proteínas nucleares. Las más relevantes son las histonas nucleosómicas, modificadas postraduccionalmente mediante acetilación, metilación y/o fosforilación. Las distintas combinaciones de estas modificaciones originan un "código" que controla el acceso de los factores de regulación a las secuencias (Tessadori *et al*, 2004; Houben *et al*, 2003; Probst *et al*, 2003).

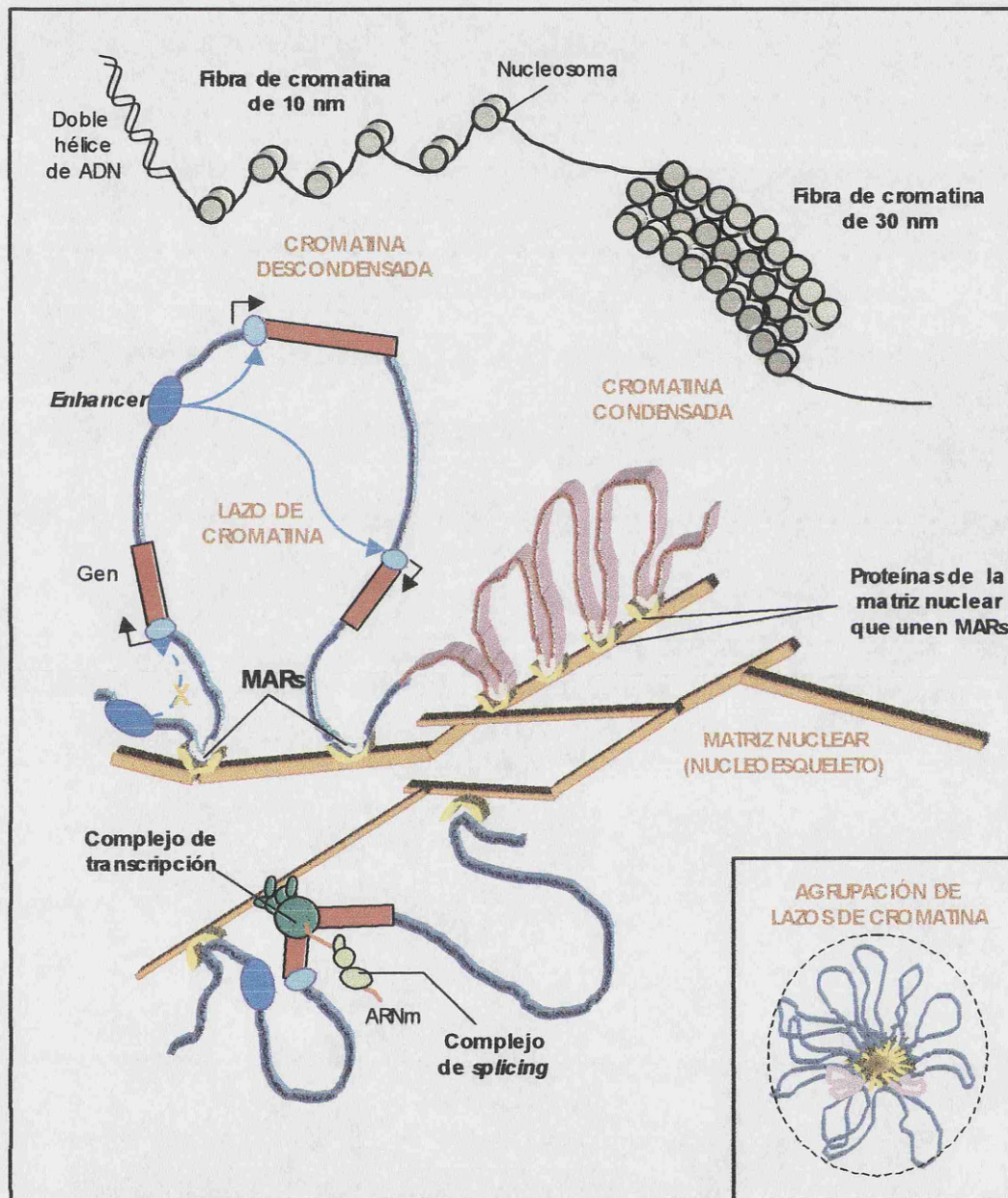
La organización estructural de la cromatina también está determinada por otras proteínas, como las que participan en el propio ensamblaje de las histonas, la presencia de proteínas no-histónicas, la acción de proteínas remodeladoras de la cromatina, y el efecto de las moléculas de ARN de cadena doble (siRNA, *small interfering RNA*) en plantas (Grasser *et al*, 2004; Steimer *et al*, 2004; Tuteja, 2003; Lusser, 2002).

El tercer nivel de organización del genoma se sustenta en la interacción entre determinados elementos de la cromatina denominados **S/MARs** (**Scaffold/Matrix Attachment Region**) y determinadas proteínas con capacidad de asociarse a ellas localizadas en subdominios nucleares específicos, que proporcionan una distribución intranuclear ordenada de las secuencias, las actividades génicas y los factores reguladores (Tessadori *et al*, 2004; van Driel *et al*, 2003). Los elementos MAR son regiones de ADN con propiedades de *enhancer* que constituyen un tipo especial de *insulators*. Se distribuyen por el genoma a intervalos de 5-200 Kb delimitando dominios independientes de expresión génica (Bode *et al*, 2003). Las MARs son reconocidas por proteínas específicas de la matriz nuclear o núcleoesqueleto, que es la estructura nuclear no-cromatínica que organiza tanto el genoma como los distintos subdominios funcionales del núcleo (Brouwer *et al*, 2002; Petersen *et al*, 2002; Allen *et al*, 2000). El ADN lineal se ancla a la matriz nuclear originando **lazos de cromatina** (Heng *et al*, 2004; Paul y Ferl, 1999) (Fig 1). Se calcula que el genoma de mamíferos está organizado en unos 60.000 lazos de cromatina de ~70 Kb de longitud, anclados a la matriz nuclear mediante regiones MAR de ~1 Kb, que contienen uno o más genes por lazo (Bode *et al*, 2003).

Estos lazos fueron descubiertos por Mirckovitch y colaboradores en 1984 mediante microscopía electrónica en núcleos *deshistonizados*, donde observaron un halo de extensos lazos de ADN anclados a la matriz nuclear. *In vivo*, cada grupo de lazos origina una unidad básica funcional (Fig 1), en la que cada lazo presenta un estado condensado o descondensado dependiendo de su estado funcional (van Driel y Fransz, 2004). Cada uno de estos lazos flanqueados por regiones MAR contiene un gen o grupo de genes (Lawrence *et al*, 2004).

Las regiones MARs no poseen secuencias específicas conservadas, sino que forman motivos estructurales reconocidos por proteínas de la matriz nuclear (Bode *et al*, 2003). La interacción entre las MARs y las proteínas sucede a través de la hendidura menor del ADN de doble cadena, o bien a través de regiones de ADN de cadena sencilla, estabilizando en este último caso los estados

transcripcionalmente activos de la cromatina (Jackson, 2003 a; Martens et al, 2002).



**Figura 1. Representación de los distintos niveles de organización del ADN genómico.**

La doble hélice de ADN lineal se organiza en torno a las histonas de los nucleosomas originando dos niveles de empaquetamiento de la cromatina: las fibras de 10 y 30 nm. La cromatina se ancla a la matriz nuclear mediante la unión específica de las regiones MAR del genoma a las proteínas MAR-binding de la misma, originando lazos de cromatina condensada (rojo) y descondensada (azul), que pueden contener uno o varios genes. Las regiones MAR inhiben el efecto de un enhancer sobre un promotor cuando se sitúan entre ambos. Los distintos complejos enzimáticos del núcleo también se unen a la MN. El genoma está organizado en unidades básicas formadas por agrupaciones de lazos de cromatina (recuadro), que contienen en muchos casos genes relacionados funcionalmente o que siguen patrones similares de expresión.

Las MARs poseen otras características: son ricas en bases AT; son inestables y tienden a formar estructuras de triple hélice que dejan libre una cadena sencilla de ADN; son hipersensibles a la digestión con DNasa I; y co-localizan frecuentemente con orígenes de replicación y sitios de unión de la Topoisomerasa II y la histona H1 (Allen *et al*, 2000; Holmes-Davis y Comai, 1998). La asociación de las MARs a la MN se produce mediante proteínas específicas con afinidad por las mismas (Tessadori *et al*, 2004). Las MARs aumentan la expresión y a veces la estabilidad de los transgenes que flanquean (Kohli *et al*, 2003; Holmes-Davis y Comai, 1998).

### Organización de los distintos subdominios nucleares

El genoma está localizado ordenadamente en el núcleo. Los distintos genes y cromosomas ocupan un espacio discreto, y la cromatina interacciona con distintos subdominios nucleares en función de su actividad génica (Stein *et al*, 2003 b).

Mediante hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) se ha demostrado que cada cromosoma ocupa un espacio concreto en el núcleo interfásico denominado **territorio cromosómico** (van Driel y Fransz, 2004). Un cromosoma no invade el territorio ocupado por los cromosomas adyacentes, y su movilidad está restringida a un radio de  $\sim 0,5 \mu\text{m}$ . La eucromatina, la heterocromatina y los brazos de un cromosoma ocupan distintas regiones en el interior de su territorio. Los genes activos se localizan en las zonas de contacto con la región intercromatínica, que corresponde al espacio nuclear que no está ocupado por el genoma, donde se localizan la mayoría de los subdominios específicos nucleares y la matriz nuclear que los organiza (Kiseleva *et al*, 2004; Ragoczy *et al*, 2003; Weierich *et al*, 2003).

El ejemplo más claro y evidente de subdominio nuclear es el **nucleolo** (Fig 2). Se organiza alrededor de los *tandems* repetidos de los genes ribosomales mayores (ADNr), que constituyen las regiones organizadoras del nucleolo (NOR)

por efecto de su actividad. Además de la biosíntesis de los ribosomas, en el nucleolo se realizan otras funciones relacionadas con la maduración de los snRNAs (Gerbi *et al*, 2003) y la retención de proteínas (Catala *et al*, 2004; Eilbracht *et al*, 2004; Le Goff *et al*, 2004; Gao *et al*, 2003), constituyendo un reservorio de dichas proteínas que evita su degradación proteolítica, y facilita su rápida disponibilidad en el núcleo en determinados momentos o estados celulares, y el mantenimiento del equilibrio homeostático intranuclear (Olson *et al*, 2002; Pederson, 2002).

Los telómeros y los centrómeros constituyen dos subdominios cromatínicos y nucleares de especial interés, ya que entre otras funciones participan en el ya descrito tercer nivel de organización del genoma (Fig 2). Ambos subdominios constituyen zonas nucleares de silenciamiento génico o cromocentros (Parada *et al*, 2004). Los telómeros previenen la degradación de los extremos lineales de los cromosomas por nucleasas, la fusión ilegítima de sus extremos o de los producidos por fragmentación cromosómica, y el acortamiento del ADN lineal por replicación incompleta de sus extremos (McKintosh *et al*, 2002). El silenciamiento se produce mediante la propagación del complejo Sir (*Silent Information Regulator*) por la cromatina, que contiene una enzima desacetilasa de histonas (Kuhn y Geyer, 2003).

Los centrómeros y la heterocromatina peri-centromérica contienen secuencias repetidas de ADN satélite, que forman las estructuras **cromocentroméricas** (Fig 2). Estas estructuras producen represión estable sobre los genes cercanos físicamente, aunque se desconoce el mecanismo. Se ha observado que determinados genes pueden recorrer largas distancias hasta coincidir con la posición ocupada por los cromocentros, lo que sucede principalmente durante los procesos de diferenciación celular en los que cambian los patrones génicos de expresión (Parada *et al*, 2004; Alcobia *et al*, 2003; Houben y Schubert, 2003).

En células vegetales, los telómeros y centrómeros ocupan posiciones opuestas en el núcleo interfásico análogas a las de anafase, lo que se conoce como configuración de Rabl (Shaw *et al*, 2002). En estos núcleos los territorios

cromosómicos son longitudinales, y la transcripción ocurre por todo el núcleo (Tessadori *et al*, 2004; van Driel y Fransz, 2004).

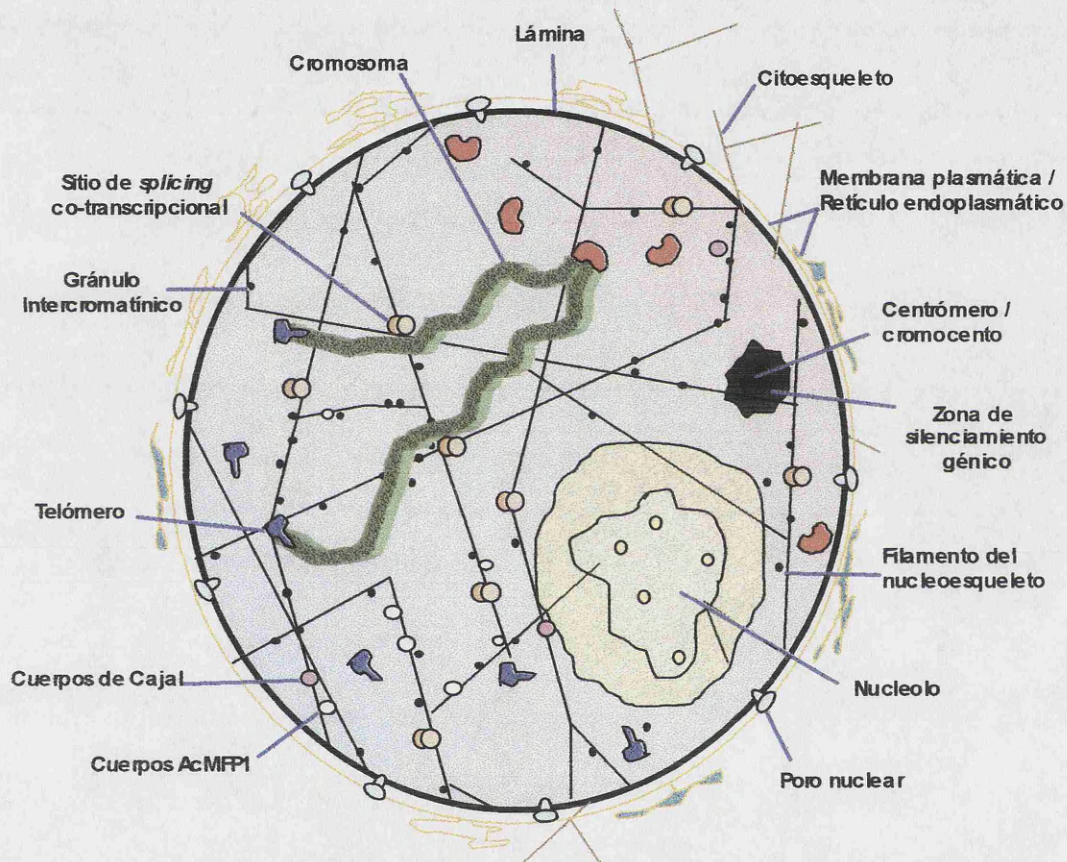
Los ejemplos más claros de interacción entre el genoma y un subdominio nuclear son los **sitios de transcripción y procesamiento, replicación y reparación** del ADN. En todos ellos confluyen de forma regulada tanto las secuencias de los ácidos nucleicos que se transcriben o replican como las enzimas, factores y cofactores que participan en cada proceso (Stein *et al*, 2003 a, b; Jackson 2003 b; Cook, 2002).

En plantas, los sitios de transcripción se encuentran dispersos en la región intercromatínica coincidiendo con la red formada por los gránulos intercromatínicos observables mediante microscopía electrónica (Černa *et al*, 2004; Moreno Díaz de la Espina *et al*, 1993; Medina *et al*, 1989). Este último subdominio es un compartimento de almacenamiento, ensamblaje y modificación de factores de *splicing*, con el que están relacionados los sitios de transcripción y *splicing* co-transcripcional detectados mediante anticuerpos contra distintos factores de *splicing* (Echeverría *et al*, 2004; Cui y Moreno Díaz de la Espina, 2003; Acevedo *et al*, 2002) (Figs 1 y 2). En células animales los procesos de transcripción y *splicing* son básicamente los mismos aunque su organización topológica difiere de la existente en plantas, probablemente debido a la distinta organización de los gránulos intercromatínicos que forman los *speckles* nucleares (Lamond y Spector, 2003; Shopland *et al*, 2003).

Existen otros subdominios nucleares con funciones específicas (Stein *et al*, 2003 a, b). Algunos son ubicuos, como los **cuerpos de Cajal** (Fig 2), denominados anteriormente *coiled-bodies*, que son subdominios de ensamblaje y maduración de los snRNAs después de ser re-importados al núcleo, donde experimentan modificaciones como metilación y pseudourilización dirigidas por los scaRNAs, antes de incorporarse a la red de gránulos intercromatínicos, donde continúa su maduración previa a su incorporación al espliceosoma (Gerbi *et al*, 2003). Otros cuerpos tienen funciones específicas, como los cuerpos PML (*Promyelocitic Leukemia*) de animales (Wang *et al*, 2004) o los cuerpos de COP1 (*Constitutively*



*Photomorphogenic protein 1*) de plantas, que participan en la represión de la fotomorfogénesis y co-localizan con proteínas reguladoras como DET, FUS y COP1, siendo esta última una proteína coiled-coil con actividad ligasa de ubiquitina E3 (Seo *et al*, 2004), y diversas proteínas fotoreceptoras transductoras de señales luminosas (Lin y Shalitin, 2003; Kircher *et al*, 2002; Wang *et al*, 2001).



**Figura 2. Esquema de los principales subdominios nucleares.**

El núcleo celular está físicamente delimitado por la envoltura nuclear, formada por la membrana nuclear, los poros nucleares y la lámina. En su interior se encuentran el nucleolo y otros subdominios como los sitios de procesamiento co-transcripcional, los gránulos intercromatínicos, los cuerpos de Cajal o los cuerpos de AcMFP1, todos ellos organizados por la matriz nuclear. En el núcleo vegetal los centrómeros tienden a ocupar el polo nuclear opuesto (rosa) al ocupado por los telómeros (azul), en la denominada configuración de Rabl.

La replicación transcurre de una forma ordenada espacio-temporalmente, donde la eucromatina descondensada replica antes que la heterocromatina condensada (Jackson, 2003 a). Cada **foco de replicación** está constituido por un grupo de replicones adyacentes que comienzan a replicar simultáneamente

(Hand, 1978). Muchos de estos focos se “encienden” simultáneamente en distintos períodos de la fase S, originando distintos patrones de distribución (Samaniego *et al*, 2002; Jasencakova *et al*, 2001; en animales Nakamura *et al*, 1986; Nakayasu y Berezney, 1989) que conservan su distribución topológica durante sucesivas generaciones (Sparvoli *et al*, 1994). Los sitios de replicación no sólo contienen las secuencias de los replicones y el ADN recién sintetizado, sino que se han detectado muchas de las proteínas, factores y enzimas involucradas en la replicación, como la ADN Polimerasa  $\alpha$ , Primasa  $\alpha$ , PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), ADN Metiltransferasa, Ligasa I, RPA (*Replication Protein A*) o CAF-1, y otras que ejercen funciones reguladoras como la ciclina A y la kinasa CDK2 (referencias en Stein *et al*, 2003 a).

### La Matriz Nuclear

La matriz nuclear (MN) es la estructura macromolecular no cromatínica que organiza los subdominios funcionales del núcleo. En un principio se definió como la estructura nuclear observable mediante microscopía electrónica después de la extracción del ADN (Fawcett, 1966), y se corresponde bastante aproximadamente con la red de ribonucleoproteínas descrita por Monneron y Bernhard (1969), conteniendo la red de gránulos intercromatínicos, las fibrillas pericromatínicas correspondientes a los transcritos primarios, los gránulos pericromatínicos y los cuerpos de Cajal. La matriz nuclear se distribuye por las regiones intercromatínicas. Está formada por dos estructuras distintas conectadas entre sí: la **lámina** asociada a la capa interna de la envoltura nuclear, y la **matriz interna** que se extiende por el interior del núcleo, y que contiene a su vez una red de filamentos ordenados que forman un **núcleo esqueleto** al que se asocian el resto de los componentes de la matriz, los lazos de cromatina y los distintos subdominios nucleares de la región intercromatínica (Yu y Moreno Díaz de la Espina, 1999) (Figs 1, 2). Se ha comprobado mediante microscopía electrónica (ME) que las redes de filamentos del citoesqueleto y el núcleo esqueleto conectan en la lámina, y que la estructura de los filamentos del núcleo esqueleto observable mediante ME en cortes sin resina es semejante a la de los Filamentos

Intermedios del citoesqueleto, lo que sugiere que podrían estar constituidos por proteínas de características similares (Nickerson, 2001). Recientemente Kiseleva y colaboradores (2004) han visualizado en oocitos de *X. laevis* mediante feSEM, la red heterogénea de filamentos del núcleoesqueleto a los que se asocian los cuerpos de Cajal y otros orgánulos subnucleares. Contienen actina y proteína 4.1 y parecen constituir canales nucleares libres de cromatina implicados en el transporte nuclear de proteínas y RNAs.

La composición polipeptídica de la matriz nuclear depende no sólo del tipo celular y el estado fisiológico, sino también del método de preparación utilizado, ya que los distintos procedimientos extraen del núcleo diferentes tipos de proteínas (Cerezuela, 1991). En general, casi todos los métodos, incluido el original diseñado por Berezney y Coffey (1974), se basan en el uso de detergentes para los lípidos de la membrana nuclear; nucleasas y tampones de baja y alta fuerza iónica para extraer los ácidos nucleicos y las proteínas que no están fuertemente unidas a la MN. Los métodos que usan alta fuerza iónica ( $\geq 2M$  NaCl) introducen inevitablemente cierto "colapso" en la estructura de la matriz nuclear (Pederson, 2000; Moreno Díaz de la Espina, 1995; Cerezuela, 1991). Esto no implica sin embargo que se produzca un reordenamiento significativo de los distintos subdominios nucleares, que conservan su morfología y distribución general, al igual que tampoco se altera la estructura de los territorios cromosómicos durante la preparación de matrices nucleares sin tratar con DNasa (Ma *et al*, 1998). Los protocolos alternativos en los que se evitan los detergentes no iónicos o los lavados hipertónicos (Jackson y Cook, 1988; Mirkovitch *et al*, 1984), producen estructuras similares a las observadas mediante microscopía electrónica (Nickerson, 2001), aunque producen MNs con una composición proteínica distinta (Moreno Díaz de la Espina, 1995).

Se han conseguido identificar algunas proteínas de la MN de plantas. Algunas de ellas son componentes de la maquinaria nuclear de replicación, como el PCNA (Samaniego *et al*, 2002) y la TOPO II (Moreno Díaz de la Espina, 1995), de *splicing* como las proteínas Sm (Echeverría *et al*, 2004; Cui y Moreno Díaz de la Espina, 2003; Acevedo *et al*, 2002), que participan en la síntesis y el

ensamblaje de ribosomas, como la nucleolina (Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1996), la TOPO I y la fibrilarina (Moreno Díaz de la Espina, 1995), UBF, ASE-1 y SURF-6 (Moreno Díaz de la Espina y de la Torre, 2003; Novillo, 1999), o que tienen un papel potencialmente estructural como NMP1 (Rose *et al*, 2003).

Algunas son proteínas *MAR-binding* y están implicadas en el anclaje de la cromatina, como MARBPs (Hatton y Gray, 1999) y AHM1 (Morisawa *et al*, 2000), y otras corresponden a enzimas nucleares modificadoras de proteínas, como la Caseína Kinasa II (Li y Roux, 1992) y la Disulfuro Isomerasa (Xu *et al*, 2002), o contienen largos dominios *coiled-coil* involucrados potencialmente en el anclaje de ácidos nucleicos y otras proteínas a componentes nucleares más estables, como NMCP1 (Masuda *et al*, 1999 y 1997), MFP1 (Jeong *et al*, 2004; Samaniego *et al*, 2001; Meier *et al*, 1996), las proteínas relacionadas con las laminas (Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993; Li y Roux, 1992; McNulty y Saunders, 1992) y NuMA (Yu y Moreno Díaz de la Espina, 1999). Recientemente se ha realizado el primer estudio proteómico de la MN de plantas en *Arabidopsis*, identificándose como componentes de la misma los homólogos de varias proteínas nucleolares, algunas proteínas *MAR-binding*, componentes ribosomales y una posible Desacetilasa de histonas (Calikowski *et al*, 2003).

### **Dinámica de las proteínas nucleares**

Los estudios *in vivo* del núcleo y las proteínas nucleares han sido posibles gracias a la aplicación de la tecnología que permite la producción de proteínas de fusión con proteínas fluorescentes, y técnicas de microscopía de fluorescencia como el fotoblanqueado y la captura de imágenes a distintos intervalos de tiempo (Iborra *et al*, 2003).

Estos estudios *in vivo* demuestran que la cromatina es una estructura dinámica, a la que se asocian y disocian proteínas constantemente, lo mismo que en el resto de las estructuras y subdominios nucleares, que aunque son morfológicamente estables su contenido está en constante y rápido intercambio con el nucleoplasma (Misteli, 2001). Las distintas proteínas nucleares muestran

también dinámicas diferentes, incluso en un mismo subdominio nuclear. En los cuerpos de Cajal, el intercambio con el nucleoplasma de la proteína SMN es 50 veces menor que el de la coilina (Sleeman *et al*, 2003). Incluso una misma proteína puede tener una fracción inmóvil retenida en un subdominio nuclear, y otra móvil capaz de difundir rápidamente por el nucleoplasma, como el transductor de señales y activador de la transcripción STAT3, cuya fracción inmóvil permanece en cuerpos nucleares co-localizando con *enhancers* y proteínas marcadoras de transcripción (Herrmann *et al*, 2004), o el caso de la ARN Polimerasa II, donde el 25% de la enzima permanece inmóvil en los complejos de pre-iniciación y el 75% restante difunde rápidamente por el núcleo (Kimura *et al*, 2002).

Los estudios *in vivo* también se han aplicado a proteínas de la matriz nuclear. La difusión de la Topoisomerasa II ha resultado ser mayor de lo esperado, descartándose como proteína capaz de formar los filamentos del núcleoesqueleto o el eje cromosómico (Christensen *et al*, 2002). De las proteínas de MN estudiadas, sólo las laminas muestran un bajo coeficiente de difusión nuclear compatible con una función estructural, coeficiente parecido al de las histonas del core (Kimura y Cook, 2001).

La información aportada por los estudios *in vivo* en los últimos años sugiere un modelo de dinámica de proteínas basado en la difusión pasiva como sistema de alta movilidad dentro del núcleo, que asegura su disponibilidad de una forma energéticamente económica. Este transporte está aparentemente facilitado por la red de filamentos del núcleoesqueleto que lleva asociadas proteínas endógenas que incluirían proteínas cargo y la actina, que se une al ATP y lo hidroliza al polimerizar facilitando este tipo de movimiento (Kiseleva *et al*, 2004). Dicha movilidad estaría reducida cuando las proteínas se incorporan a grandes complejos, o cuando interaccionan de forma transitoria con componentes nucleares de menor movilidad como la matriz nuclear (Parada *et al*, 2004; Misteli, 2001). Obviamente, la difusión pasiva no incluye el tráfico regulado y selectivo de proteínas de gran tamaño entre el citoplasma y el núcleo, que sucede a través de los complejos de poro nuclear de la envoltura nuclear, y donde son



necesarias señales de localización nuclear y proteínas que las reconozcan y participen en su transporte, como las importinas o las proteínas RanGAP (Rose *et al*, 2004 b).

### **Proteínas *coiled-coil* y Filamentos Intermedios**

Los dominios *coiled-coil* constituyen motivos proteicos de oligomerización. Están constituidos por dos o más  $\alpha$ -hélices anfipáticas con patrones repetidos de siete amino ácidos, donde residuos polares y apolares ocupan posiciones determinadas que permiten el superenrollamiento de dos o más dominios *coiled-coil* (Burkhard *et al*, 2001). Los dominios *coiled-coil* pueden ser cortos, como las cremalleras de leucinas de los factores de transcripción (Newman y Keating, 2003). También pueden ser dominios largos de varios cientos de aminoácidos, localizados en proteínas con variadas funciones, asociadas en numerosas ocasiones con telómeros, centrómeros, centrosomas, la cromatina y la matriz nuclear (Moreno Díaz de la Espina y de la Torre, 2003).

Los Filamentos Intermedios (FIs) son un tipo de proteínas *coiled-coil*. Son los componentes mayoritarios del citoesqueleto y del núcleoesqueleto. Poseen una organización tripartita, con dos dominios con estructura no en  $\alpha$ -hélice que flanquean a un dominio central formado generalmente por cuatro subdominios *coiled-coil*, separados entre sí por secuencias de conexión sin estructura en  $\alpha$ -hélice (Herrmann y Foissner, 2003;). El dominio central varía en secuencia y longitud entre especies, lo que provoca la heterogeneidad de esta familia de proteínas (Mattout-Drubezki y Gruenbaum, 2003). Los FIs están divididos en cinco familias multigénicas, en función de la similitud de secuencia, contenido intrónico y patrón de expresión, siendo la familia de las laminas los únicos FIs nucleares (Strelkov *et al*, 2003).

El ensamblaje de los FIs sucede mediante oligomerización de los dominios centrales de las proteínas, que originan heteropolímeros en cuyo ensamblaje participan diversas proteínas específicas asociadas (Herrmann y Aebersold, 2001). La

fosforilación-defosforilación regulada de los Fls, y de las proteínas *coiled-coil* en general, permite la creación de una reserva de subunidades solubles capaces de repolimerizar con gran celeridad (Eriksson *et al*, 2004; Inagaki *et al*, 1996). Se piensa que dichas modificaciones podrían modular la dinámica de la MN *in vivo* (Moreno Díaz de la Espina y de la Torre, 2003), como sucede en el caso de las laminas, donde la fosforilación coordinada de determinados sitios de sus secuencias provoca el ensamblaje o desensamblaje de la lámina dependiente del ciclo celular (Moir *et al*, 2000).

### **Proteínas relacionadas con los Fls de la matriz nuclear de plantas**

Aparte de las laminas, otras proteínas de la MN comparten características funcionales o estructurales con los Fls. Poseen dominios *coiled-coil* u otros dominios que confieren capacidad de polimerizar y formar filamentos similares a los Fls, o la capacidad para unir regiones MAR o ADN satélite (Moreno Díaz de la Espina y de la Torre, 2003). Además, los Fls citoplasmáticos están conectados con los elementos estructurales de la MN (Tolstonov *et al*, 2002), por lo que se piensa que el núcleoesqueleto podría estar constituido por proteínas de tipo FI (Barboro *et al*, 2003; Nickerson, 2001).

Hasta el momento no se han detectado los genes de las laminas ni los de sus proteínas asociadas en los genomas secuenciados de *Arabidopsis* y arroz, aunque parece improbable que la ausencia de los ortólogos de las laminas signifique también la pérdida de sus funciones en plantas, que están probablemente conservadas en proteínas estructural y funcionalmente similares (Rose *et al*, 2004 a; Moreno Díaz de la Espina y de la Torre, 2003). Anticuerpos anti-laminas de animales reconocen algunas proteínas *coiled-coil* en la MN vegetal (Blumenthal *et al*, 2004), algunas de ellas con Mr, pI y distribución nuclear similar a la de las laminas de vertebrados (Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993; Li y Roux, 1992; McNulty y Saunders, 1992). Además, aunque las proteínas asociadas a laminas no estén conservadas en *Arabidopsis*, la célula transformada es capaz de dirigir a la lámina un fragmento del receptor de la lamina B conjugado con GFP (Irons *et al*, 2003).

Al contrario que en animales y levaduras, sólo se han descrito unas pocas proteínas con extensos dominios coiled-coil en plantas (Rose *et al*, 2004 a), incluidas las de la familia FPP (*Filament-like Plant Proteins*) de *Arabidopsis*, tomate y arroz (Gindullis *et al*, 2002). Solamente cuatro de ellas forman parte de la MN de plantas: las proteínas relacionadas antigénicamente con las laminas (Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993; Li y Roux, 1992; McNulty y Saunders, 1992), los homólogos de NuMA (Yu y Moreno Díaz de la Espina, 1999), NMCP1 (Masuda *et al*, 1999 y 1997) y MFP1 (Jeong *et al*, 2004 y 2003; Samaniego *et al*, 2001; Harder *et al*, 2000; Samaniego, 1999; Meier *et al*, 1996).

### **MFP1 (MAR-binding Filament-like Protein 1)**

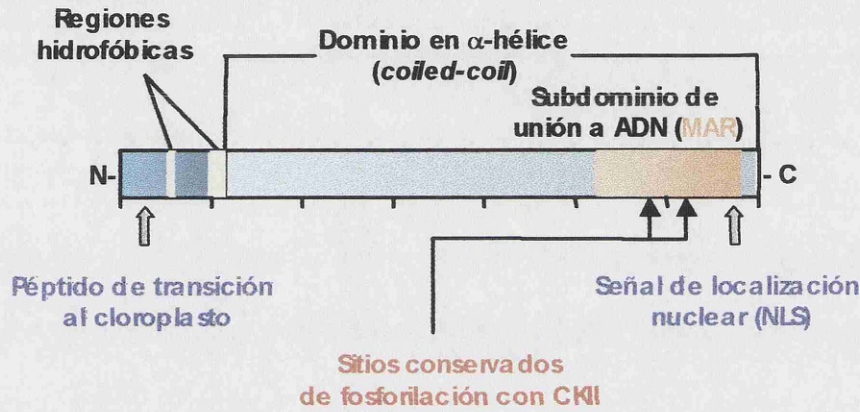
Se conoce la secuencia completa de la proteína MFP1 de tres especies vegetales distintas: LeMFP1 de tomate (*Lycopersicon esculentum*), AtMFP1 de *Arabidopsis thaliana* y las dos proteínas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), NtMFP1-1 con una longitud de 722 aminoácidos similar a las anteriores, y NtMFP1-2, con sólo 398 aminoácidos (Harder *et al*, 2000; Meier *et al*, 1996), aunque hasta el momento sólo se ha detectado la de mayor tamaño.

La similitud de las secuencias MFP1 varía entre especies, estando muy conservadas entre sí las dos proteínas de tabaco (92%), conservadas entre tomate y tabaco (~78%), y poco conservadas entre tabaco / tomate y *Arabidopsis* (42%) (Harder *et al*, 2000). Sin embargo, todas las proteínas poseen una estructura similar compuesta por dominios muy conservados (Fig 3). En el extremo N-terminal se encuentra un dominio corto sin estructura secundaria en  $\alpha$ -hélice en el que se localizan dos regiones hidrofóbicas, una de ellas conservada en proteínas transmembrana, que permitirían la interacción de MFP1 con las membranas lipídicas (Meier *et al*, 1996). Desde este subdominio hasta el extremo C-terminal se extiende un largo dominio en  $\alpha$ -hélice, cuya disposición periódica de aminoácidos apolares predice un extenso dominio coiled-coil, que presenta similitud de secuencia con otras proteínas coiled-coil, como la lamina B, NuMA y



CENP-E de la matriz nuclear, y filamentos intermedios citoplasmáticos como la miosina y la tropomiosina (Meier *et al*, 1996).

### MFP1: MAR-binding Filament-like Protein 1



**Figura 3.** Esquema de los dominios conservados en las proteínas MFP1 de tomate, tabaco y *Arabidopsis*.

LeMFP1, NtMFP1 y AtMFP1 poseen dos dominios principales, uno en el extremo N-terminal que carece de estructuras en  $\alpha$ -hélice, donde se han detectado un péptido de transición a cloroplastos y dos regiones hidrofóbicas, una de ellas conservada en proteínas transmembrana. El resto de la proteína forma un extenso dominio *coiled-coil*, que incluye en el extremo C-terminal una señal de localización nuclear (NLS) y un subdominio de unión a ADN, o a regiones MAR en el caso de LeMFP1, donde se han detectado dos sitios de fosforilación específicos para la Caseína Kinasa CK2 que probablemente regulan dicha unión.

En la parte mas próxima al extremo C-terminal de LeMFP1 se encuentra un subdominio de reconocimiento y unión a regiones MAR (Meier *et al*, 1996), o de unión a ADN en general en el caso de AtMFP1 (Jeong *et al*, 2003). En todas las secuencias MFP1 se han detectado numerosos motivos potenciales de fosforilación para la Caseína Kinasa CK2, y dos de ellos muestran una posición conservada entre especies en el subdominio de unión ADN, habiéndose demostrado que la fosforilación de los mismos inhibe y probablemente regula la unión a ADN *in vivo* (Jeong *et al*, 2004).

MFP1 es una proteína conservada en plantas detectada como una banda de 80 KDa en soja, arroz, maíz y trigo (Harder *et al*, 2000). Su localización

subcelular se ha estudiado principalmente mediante fraccionamiento celular, habiéndose detectado la proteína en fracciones de núcleos y matrices nucleares aisladas (Jeong *et al*, 2003; Meier *et al*, 1996). Mediante el mismo suero anti-LeMFP1 también se han identificado dos proteínas homólogas de 80 y 90 KDa en fracciones nucleares de cebolla. La primera es una proteína soluble que se extrae de los núcleos mediante detergente, mientras que una proporción importante de la proteína de 90 KDa forma parte de la matriz nuclear (Samaniego *et al*, 2001; Samaniego, 1999).

Poco se sabe sobre la distribución nuclear de MFP1, aunque se ha detectado la proteína de fusión MFP1-GFP en los plastidios vegetales que rodean al núcleo de células en suspensión (Jeong *et al*, 2003; Gindullis y Meier, 1999). LeMFP1, NtMFP1 y AtMFP1 contienen una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo C-terminal, y un péptido de transición a cloroplastos en el N-terminal, por lo que se piensa que MFP1 podría tener una doble localización en los cloroplastos y el núcleo celular (Jeong *et al*, 2003), aunque hasta el momento sólo la proteína de 90 KDa de cebolla muestra una inequívoca distribución nuclear, localizada en una nueva categoría de cuerpos nucleares anclados a la matriz nuclear y distribuida por los filamentos del núcleoesqueleto (Samaniego *et al*, 2001; Samaniego y Moreno Díaz de la Espina, 2000; Samaniego, 1999).

Se conocen muy pocas proteínas con una doble distribución en núcleos y cloroplastos. El genoma del cloroplasto contiene más de 120 genes, unos 80 de ellos relacionados con los componentes del aparato fotosintético (Koumandou *et al*, 2004). Sin embargo, el genoma nuclear contiene más de 3.000 genes que codifican proteínas localizadas en el cloroplasto, y se sabe que ambos genomas están coordinados mediante una vía de señalización actualmente poco conocida. Se especula que proteínas como la Mg-protoporfirina podrían participar en esta ruta de transducción de señales (Gray, 2003). Recientemente, se ha detectado en el núcleo la isoforma de la proteína de unión a ARN del cloroplasto STEP1 (*Single-stranded TElomere-binding Protein 1*), que se une a los telómeros nucleares donde podría regular la longitud de los mismos reprimiendo la actividad de la telomerasa (Kwon y Chung, 2004).

En esta Tesis Doctoral se pretende caracterizar las proteínas homólogas de MFP1 en *A. cepa* mediante nuevos sueros anti-MFP1, lo que supone la continuación de los estudios iniciados durante la Tesina de Licenciatura (Samaniego, 1999). Se profundizará en la expresión, fosforilación y distribución subcelular de las proteínas en distintos estados, tipos y tejidos celulares de cebolla, estudiándose además cómo se regula la unión del homólogo de 90 KDa a la matriz nuclear. También se investigará la controvertida fracción nuclear de MFP1 en tabaco, tomate y *Arabidopsis*, así como la relación de MFP1 con el ADN del nucleóide.

## OBJETIVOS

En base a los antecedentes expuestos, los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Identificación y caracterización de las proteínas AcMFP1 mediante sueros específicos y clonación de las mismas.
2. Estudio de su expresión y distribución subcelular en distintos tejidos y tipos celulares.
3. Análisis de su relación con otros subdominios nucleares funcionales.
4. Análisis comparativo de la distribución de MFP1 en cebolla y otras especies en las que se conoce la secuencia de la proteína.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## I. MATERIAL

### 1. Especies

Se utilizaron células de raíz y hoja de bulbos de *Allium cepa* L variedad francesa. Para el análisis comparativo de distribución en otras especies se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* L, *Lycopersicon esculentum* L y *Arabidopsis thaliana* L, así como plantas de *N. tabacum* transformadas con *AtMFP1* y el knockout de *AtMFP1* en *A. thaliana*, cuyas semillas fueron facilitadas por el Dr. Sun Yong Jeong y la Dra. Iris Meier del *Plant Biotechnology Center, The Ohio State University*, EEUU.

### 2. Cultivos

#### 2.1. Cultivos de cebolla

Los bulbos de cebolla se pelaron, lavaron y dispusieron sobre tubos con la corona radicular sumergida en agua corriente que se renovó cada 24 horas, incubándose en la mayoría de los casos a  $25 \pm 0,5^\circ$  C, en oscuridad y con aireación constante (10-20 ml / min). En estas condiciones se produjo el desarrollo de raíces y hojas. Las raíces tardaron de dos a tres días en alcanzar los 2-3 cm necesarios para que la población meristemática alcance el equilibrio de proliferación. En los estudios sobre el efecto de la luz los bulbos se incubaron a temperatura ambiente siguiendo un ciclo de luz solar / oscuridad (10 / 14h), o en oscuridad total. Se hicieron entonces tomas de segmentos de 0,5 mm de distintas zonas radicales y foliares mediante escisión con una cuchilla sobre una superficie milimetrada (Fig 4 a).

Los meristemas durmientes se obtuvieron con una pinza directamente de la corona radicular de los bulbos, tomando la raíz y escindiendo con una cuchilla la zona meristemática situada entre el primer y el segundo milímetro desde el extremo apical de la misma.

### **2.1.1. Cultivos sincronizados de cebolla**

La sincronización celular se realizó en raíces con una longitud mínima de 2 cm. Se cambiaron entonces los bulbos a nuevos tubos que contenían 0,75 mM hidroxíurea (Sigma) disuelta en agua corriente, en la que permanecieron durante las siguientes 14 horas en las mismas condiciones de cultivo. Pasado este tiempo, los bulbos se lavaron y cambiaron de nuevo a agua corriente, liberando a las células del bloqueo de la replicación inducido por la hidroxíurea (HU) y permitiendo la entrada sincrónica de la población celular proliferante en la fase S del ciclo celular. La evolución de la ola de células sincronizadas se monitorizó mediante citometría de flujo valorando los contenidos de ADN celular (Apartado 6 de Material y Métodos).

En las poblaciones celulares sincronizadas se estudió la distribución de los sitios de replicación durante la fase S mediante la incorporación de pulsos de 45 min. a 1 hora con BrdU (análogo de la Timidina) en los sitios de nueva síntesis de ADN, seguido de su inmunodetección con anticuerpo anti-BrdU (Amersham). Se analizaron cuatro momentos de la fase S: G1 / S-temprano, S-temprano, S-tardío y S-tardío / G2. Para ello, 2 horas (h) antes de completar las 14 h de tratamiento con HU, y 1, 4 y 6 horas después de la liberación del bloqueo con agua se dieron los respectivos pulsos incubando los bulbos en agua corriente con  $10^{-4}$  M BrdU (Sigma) durante 45 min-1h en oscuridad (Fig 26 a). A continuación se tomaron las muestras sincronizadas seccionando, fijando y procesando los meristemos radiculares para inmunodetección en membrana y de fluorescencia (Apartados 2 y 4 de Material y Métodos).

## **2.2. Cultivo de tabaco, tomate y *Arabidopsis***

Las semillas se sumergieron durante 30 minutos en agua esterilizada que contenía 1,5% lejía concentrada y 1% Tween-20, después se lavaron 4 x 30 min. en



agua esterilizada y se dejaron en el último lavado a 4° C toda la noche. Las semillas depositadas en el fondo del tubo se sembraron sobre placas con medio de cultivo Murashige y Skoog pH 5,8 (0,4% MS; 3% sacarosa; agar 0,6%), se sellaron y se incubaron en cámara de cultivo con un foto-periodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 25°C durante 2-3 semanas. También se sembraron semillas sobre tierra estéril y se incubaron en la misma cámara de cultivo, cubiertas con una bolsa de plástico para favorecer la máxima humedad durante las primeras semanas.

### 3. Anticuerpos

- Sueros 288 y 91: Sueros policlonales desarrollados en conejo contra el dominio central en  $\alpha$ -hélice de LeMFP1 y el dominio en  $\alpha$ -hélice completo de AtMFP1, respectivamente (Fig 5). Los sueros preinmunes 288 y 91 corresponden a sangrados del animal previos a la inoculación antigénica. Estos sueros fueron facilitados por la Dra. Iris Meier y el Dr. Sun Yong Jeong, del *Plant Biotechnology Center, The Ohio State University*, Estados Unidos.

- Anticuerpo 4G3: Anticuerpo monoclonal comercial (Organon Teknica) de ratón que reconoce la proteína U2B'' de la partícula ribonucleoproteica U2 del espliceosoma.

- Suero Y12: Anticuerpo monoclonal comercial (Neomarkers) que reconoce los epítomos simétricos de dimetilarginina (sDMA) de las proteínas Sm y otras proteínas nucleares como la coilina.

- Anticuerpo anti-BrdU (clon B-U1): anticuerpo comercial (Amersham) de ratón que reconoce la 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), análogo de la Timidina.

## **II. MÉTODOS**

### **1. Fraccionamiento celular**

#### **1.1. Aislamiento de núcleos**

Los segmentos correspondientes de hojas y/o raíces se recogieron en medio de aislamiento de núcleos (Apéndice A, tabla 1). Los núcleos se aislaron siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

##### ♦ *Equilibrado de las muestras en medio de aislamiento*

1. Se sumergieron los fragmentos de raíces u hojas en medio de aislamiento fresco y se dejaron sobre hielo en una cámara de vacío durante 15-30 min, para favorecer la entrada del medio al interior de las células.

##### ♦ *Rotura celular*

2. A continuación se sustituyó el medio de aislamiento por medio fresco, en la proporción de ~3 ml de medio por gramo de muestra. Las muestras se homogeneizaron sobre hielo mediante 3 golpes consecutivos de 10-30 segundos en un homogeneizador ULTRA-TURRAX de alta velocidad (20.000 rpm). El homogeneizado obtenido se filtró a través de tres mallas de nylon de 100, 50 y 30  $\mu\text{m}$ , superpuestas de tal forma que la muestra las atraviesa de mayor a menor tamaño de poro.

3. Se repitió el proceso 2 veces más, resuspendiendo el material retenido en los filtros en nuevo medio de aislamiento de núcleos.

##### ♦ *Purificación de los núcleos*

4. Todo el material filtrado se centrifugó a 2.500 rpm, 4°C durante 10 min. en una centrífuga Hettich Universal-32R. Se conservó el primer sobrenadante que contenía gran parte del material citoplasmático (fracción **Cit**), excluyendo los orgánulos que co-purifican con los núcleos. El sedimento se lavó en medio de

aislamiento fresco varias veces más, comprobando el grado de pureza e integridad de los núcleos mediante un microscopio óptico, tiñéndolos con verde de metilo-pironina.

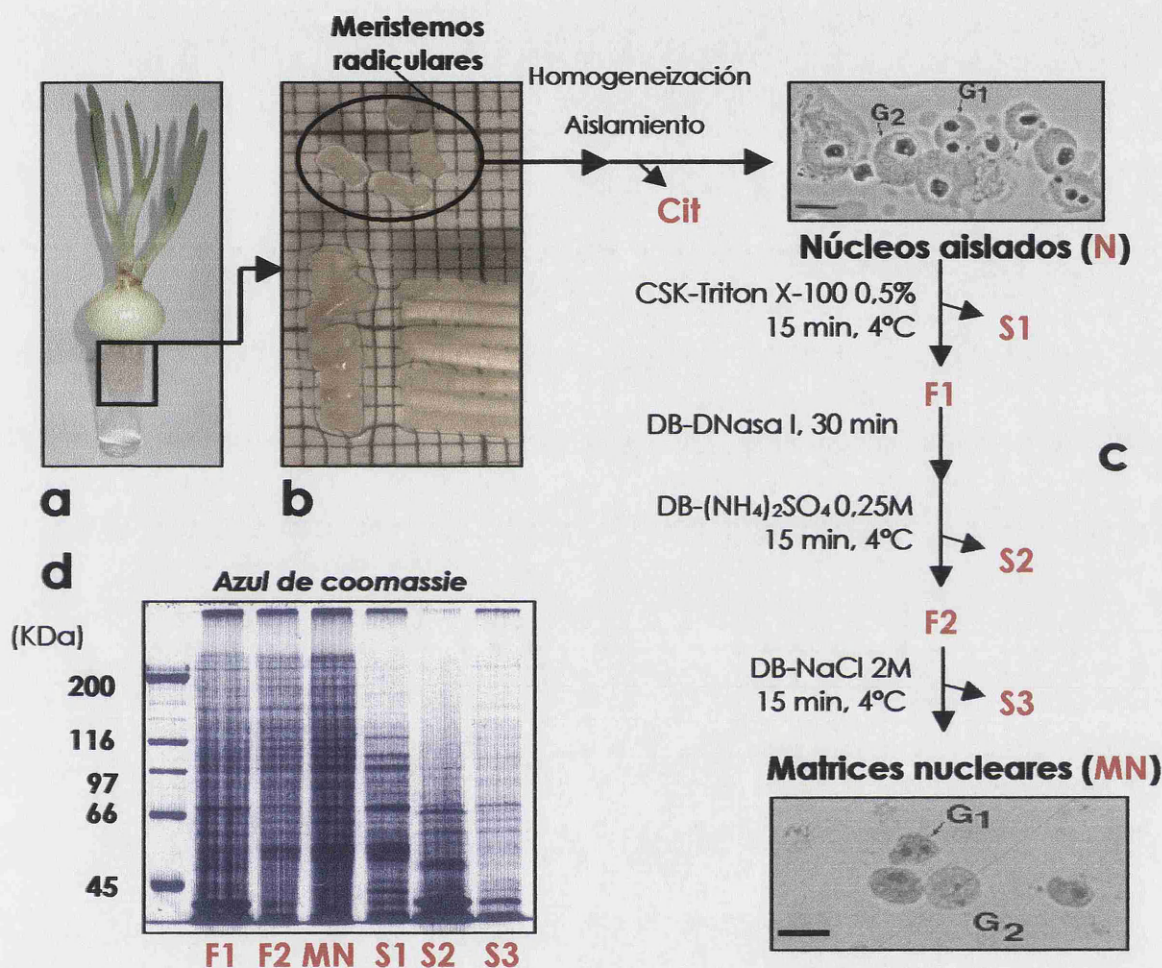
5. Una vez conseguido el grado de pureza óptimo, los núcleos aislados (fracción **N**) se utilizaron inmediatamente para la obtención de otras fracciones, se procesaron para el análisis de proteínas o microscópico, o se conservaron a -28°C en medio de extracción de núcleos, que contiene un 30% de glicerol.

## **1.2. Extracción de matrices nucleares mediante alta fuerza iónica**

Se utilizó el procedimiento usual del laboratorio, descrito por Yu y Moreno Díaz de la Espina (1999) (Fig 4), consistente en:

- I. Resuspensión de los núcleos aislados en tampón CSK, que contiene 0,5% del detergente no-iónico Triton X-100 (Apéndice A, tabla 2) e incubación en hielo 15 min.
- II. Centrifugación a 2.500 rpm 15 min. a 4°C, recogiendo los restos de las membranas nucleares y las proteínas nucleares solubles en el sobrenadante (**S1**).
- III. Digestión del sedimento (**F1**) con 200 µg / ml DNasa I libre de RNasa (Sigma), diluida en medio de digestión DB (Apéndice A, tabla 3), que contiene NaCl, incubando durante 30 min. a temperatura ambiente.
- IV. Adición de sulfato amónico 1 M disuelto en medio DB hasta alcanzar una concentración 0,25 M, e incubación en hielo durante 15 min. adicionales.
- V. Centrifugación a 3.000 rpm 10 min. a 4°C, recogiendo entre otros el ADN digerido y sus proteínas asociadas en el sobrenadante (**S2**).
- VI. Obtención de las matrices nucleares añadiendo lentamente NaCl 4M en medio DB al sedimento **F2**, resuspendido en el mismo medio, hasta conseguir una concentración final 2M, e incubación en hielo durante 15 min. adicionales.
- VII. Centrifugación a 3.000 rpm 10 min. a 4°C, recogiénose las proteínas unidas más débilmente a la matriz nuclear en el sobrenadante (**S3**), y la fracción correspondiente a la matriz nuclear en el sedimento (**MN**).

VIII. Lavado adicional en medio DB de la fracción MN para eliminar las sales, repitiendo la centrifugación.



**Figura 4. Método de extracción de matrices nucleares de células meristemáticas con alta fuerza iónica.**

(a) Bulbo de cebolla en cultivo con hojas y raíces. (b) Escisión de las zonas meristemáticas de las raíces sobre una superficie milimetrada. (c) Esquema del método utilizado de aislamiento de matrices nucleares. Se indican en rojo las distintas fracciones obtenidas durante el proceso. **Cit**: contenido *citoplasmático* recogido en el sobrenadante tras la rotura celular; **N**: núcleos aislados; **S1**: sobrenadante recogido tras permeabilizar con Triton X-100, contiene RNPs, las proteínas nucleares solubles y las asociadas a la membrana nuclear. Está enriquecido en bandas <120 KDa; **F1**: proteínas nucleares residuales no recogidas en S1; **S2**: sobrenadante recogido tras digerir con DNasa I y baja fuerza iónica, contiene la mayor parte del ADN y las histonas. La mayoría de las bandas son <100 KDa, identificándose las dos variantes de la histona H1 por debajo de 45 KDa; **F2**: proteínas nucleares residuales no recogidas en S1 y S2; **S3**: sobrenadante recogido tras extraer con alta fuerza iónica, contiene las proteínas unidas débilmente a la matriz nuclear. Sus bandas principales corresponden a las variantes de la histona H1 y a varias proteínas de ~60 KDa; y **MN**: proteínas del nucleoesqueleto y las fuertemente unidas a la matriz nuclear. Se muestran dos imágenes de microscopía óptica correspondientes a núcleos teñidos con verde de metilo-pironina y matrices nucleares aisladas. (d) Proteínas de las distintas fracciones separadas mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 8% y teñidas con azul de Coomassie.

Los sobrenadantes (Cit, S1, S2 y S3) obtenidos en los distintos pasos de la extracción se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) y se utilizaron en el estudio de la solubilidad de las proteínas, como se describirá más adelante. De igual forma, los sedimentos se utilizaron en el análisis de proteínas y la inmunodetección *in situ*.

### **1.3. Extracción de matrices nucleares mediante el método de LIS**

Se utilizó el procedimiento usual del laboratorio descrito en Moreno Díaz de la Espina (1995), consistente en:

- I. Digestión de los núcleos aislados en 100  $\mu\text{g}$  / ml DNasa I diluida en medio DB durante 30 min. a temperatura ambiente, y centrifugación posterior a 3.000 rpm 10 min.
- II. Incubación durante 15 min. en 25 mM 3,5-diiodosalicilato de litio (LIS) diluida en medio de LIS (Apéndice A, tabla 4), y centrifugación a 3.000 rpm 10 min.
- III. Digestión adicional del sedimento con 200  $\mu\text{g}$  / ml DNasa I diluida en medio DB durante 30 min. a temperatura ambiente, centrifugando a 3.000 rpm 10 min.
- IV. Lavados adicionales en medio DB, 3x10 min.

## **2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **2.1. Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE)**

Las electroforesis de proteínas se realizaron en una cubeta de SDS-PAGE MINI-PROTEAN II de BIO-RAD para geles verticales (11 cm largo x 7,5 cm ancho), separando las proteínas en función de su movilidad relativa ( $M_r$ ) en geles de acrilamida / bisacrilamida.

La concentración de acrilamida se determinó en función del rango de peso molecular de las proteínas en estudio, siendo las concentraciones más usadas las comprendidas entre 8-10% para el gel de separación y 3-4% para el de concentración, lo que nos permitió obtener una óptima separación de proteínas en el intervalo 40-160 KDa.

Previamente a la realización de las electroforesis monodimensionales, las muestras se sometieron a un proceso de preparación, desnaturalización y valoración de la concentración de proteínas:

### **2.1.1. Preparación de muestras**

- Se precipitaron las proteínas solubles de los sobrenadantes (S1, S2, S3), añadiendo TCA (ácido tricloroacético) hasta el 10% incubando de 30 a 60 min. en hielo. Pasado este tiempo, se centrifugaron los sobrenadantes a 12.000 rpm durante 5 min. a 4° C.
- Se lavaron los sedimentos con etanol/éter (1:1 v/v) al menos tres veces para eliminar el TCA. Las muestras se pueden dejar en uno de los lavados toda la noche a -20°C.

### **2.1.2. Desnaturalización de proteínas**

1. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm, 10 min. a 4° C y se disolvieron en el medio adecuado, normalmente medio de disociación 2x (Apéndice A, tabla 5). Se utilizaron aproximadamente 2 volúmenes de medio de disociación por cada volumen de muestra.
2. Se calentaron las muestras 3 min. a 95° C, dejándolas atemperar después.
3. Las muestras se ultrasonicaron en un sonicador BRANSON sonifier 150, al 40% de potencia con tres golpes de 5 segundos, en hielo y a intervalos de 5 segundos, se dejaron atemperar. Se calentaron de nuevo a 95° C durante 3-5 min. para conseguir una mejor desnaturalización de las proteínas (el calentamiento se repitió inmediatamente antes de cargar las muestras durante la electroforesis).

### 2.1.3. Valoración de proteínas

La valoración se realizó utilizando la técnica de réplica en gota o *Dot Blot*, exceptuando cuando se utilizaron las muestras en análisis cuantitativos que se realizó de forma más precisa mediante el método de Bradford. Éste se basa en la absorción específica a 595 nm de las proteínas unidas a azul de Coomassie G-250 en medio ácido, empleando el reactivo comercial de *Bio-Rad Protein Assay*.

#### *Técnica de réplica de gota o Dot Blot:*

1. Se pusieron sobre la membrana 5 gotas de la solución patrón de seroalbúmina bovina (BSA) a distintas concentraciones: 50, 25, 10, 5 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
2. A su lado se colocaron gotas de 1  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras.
3. Después de teñir la membrana 5 min. con Amidoblack (Apéndice A, tabla 6) y desteñir con solución de desteñir geles (Apéndice A, tabla 7), se valoró la concentración por la semejanza de tonalidad azulada entre las muestras y las gotas de BSA.

#### *Método de Bradford:*

1. Se tomaron alícuotas de las proteínas y se completaron hasta 0,8 ml con agua destilada, añadiendo posteriormente 0,2 ml del reactivo comercial. Se agitaron para conseguir la formación de complejos entre el azul de Coomassie y las proteínas presentes.
2. La lectura de densidad óptica se realizó a 595 nm después de 5 min. a 1 hora de espera tras añadir el reactivo. Los valores obtenidos se refirieron a una curva patrón realizada simultáneamente con la proteína patrón BSA (1,25-25  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), intervalo para el que existe una relación lineal entre densidad óptica y concentración de proteína.

### 2.1.4. Desarrollo de la electroforesis

Se cargaron normalmente 10  $\mu\text{g}$  de proteína por pocillo. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y con un voltaje constante de 60 V para el gel

de concentración y 100-120 V para el gel de separación. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis 1x (Apéndice A, tabla 8), utilizando normalmente patrones de medio y bajo rango (Bio-Rad) para determinar la movilidad relativa de las proteínas.

## **2.2. Electroforesis bidimensional**

Las proteínas se separaron en función de su carga eléctrica neta en una primera fase (isoelectroenfoque, IEF) y en función de su movilidad relativa en una segunda (SDS-PAGE). Como medios de solubilización de proteínas se utilizaron tampón de disociación para IEF (Apéndice A, tabla 10) y otras combinaciones resumidas en la Tabla 1.

### **2.2.1. Doble solubilización de muestras de núcleos y MN para electroforesis bidimensional**

Las muestras de MN se lavaron en medio DB y a continuación en un medio sin sales (agua dd; 0,5% Triton X-100; 1 mM PMSF; 2 mg / ml aprotinina; 20 mM DTT) 2x30 min. y/ o una noche a 4° C, para extraer las sales que puedan quedar de los medios CSK y DB. A continuación se realizó una doble solubilización de las muestras:

- En primer lugar se solubilizaron las fracciones MN en un pequeño volumen de medio que contenía SDS (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; **1-2% SDS**; 10% 2-mercaptoetanol; 20% glicerol; 0,002% azul de bromofenol), seguido de ultrasonidos y calentamiento a 95° C durante 5 min.
- A continuación, el volumen de muestra se diluyó en un medio de dilución para bidimensionales (9,8 M urea; 2% pharmalitos pH 3-10; **5% Triton X-100**; 100 mM DTT) hasta alcanzar una razón SDS : TX-100 de al menos 1:8 y una concentración final de SDS <0,25%.



### 2. 2. 2. Isoelectroenfoque (IEF) o primera dimensión

Se cargaron las soluciones de proteínas y se separaron en tiras de geles de acrilamida de 7 ó 11 cm (PHARMACIA o Bio-Rad), rehidratadas en medio de rehidratación para IEF (Apéndice A, tabla 11). Los geles contenían pharmalitos y un gradiente de pH inmovilizado de 3 a 10, creciente de ánodo a cátodo. Las muestras se aplicaron cerca del ánodo y comenzaron a migrar en el campo eléctrico en función de su carga neta.

La duración del IEF osciló entre las 22-24 horas y se desarrolló en una cubeta MULTIPHOR II de PHARMACIA con un circuito de refrigeración, modificando el voltaje de la siguiente manera:

	V	mA	W	Tiempo
<b>1ª Fase</b>	300	Máxima	Máxima	3 horas
<b>2ª Fase</b>	De 300 a 1400 (intervalos de 30')	Máxima	Máxima	4 horas
<b>3ª Fase</b>	1400	Máxima	Máxima	13 horas
<b>4ª Fase</b>	2000	Máxima	Máxima	3-4 horas

Las tiras de IEF que no se utilizaron inmediatamente para la segunda dimensión se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  ó  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. SDS-PAGE (segunda dimensión)

Se utilizaron geles de acrilamida al 8-10% para el gel de separación y al 4% para el de concentración. Como patrones de peso molecular se utilizaron los mismos marcadores de rango medio y bajo de peso molecular que en las electroforesis monodimensionales.

Los geles de IEF, que contenían las proteínas separadas según su pI, se equilibraron en solución de equilibrado (Apéndice A, tabla 12) en dos fases de 10

min. cada una. En la primera, las tiras se introdujeron en solución de equilibrado con DTT 25mg /10ml. En la segunda, la solución de equilibrado contenía iodo acetamida 0,45g /10 ml. Una vez equilibradas las tiras de IEF, se colocaron sobre el gel de la segunda dimensión y se inició la electroforesis como se describió anteriormente.

## **2.4. Electrotransferencia**

Se utilizó un sistema de transferencia húmedo. La cubeta utilizada fue la MINI-PROTEAN II de BIO-RAD con el módulo MINI TRANS-BLOT para geles de 7,5 x 10 cm y membranas de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m de poro (Schleicher & Schuell ).

Las condiciones de transferencia fueron de 100 V constantes durante 1-2 h en hielo y en el tampón indicado en el Apéndice A, tabla 9. Una vez finalizada la transferencia se detectaron las proteínas transferidas como control de carga tiñendo la membrana con rojo Ponceau al 2%, y se marcaron con lápiz los límites del gel y la posición de los marcadores de peso molecular en las membranas, conservándose a -20° C si no se usaban inmediatamente.

## **2.5. Inmunodetección en membrana**

Se utilizó el siguiente protocolo:

1. Prelavado de la membrana con PBS (Apéndice A, tabla 13) + 0,05% Tween-20 durante 10 min.
2. Bloqueo de las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos incubando de 30 min. a 1 hora en una solución de bloqueo, que contenía leche en polvo descremada al 5% en PBS + 0,05% Tween-20.
3. Incubación de la membrana con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, durante dos horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Las diluciones utilizadas para cada anticuerpo primario se especifican en el Apéndice B, tabla 1.

4. Lavados con PBS + 0,05% Tween-20, 3x10 min.
5. Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, específico contra la clase de inmunoglobulina y especie animal del anticuerpo primario, diluido en solución de bloqueo durante 1 hora. Las diluciones utilizadas para cada anticuerpo secundario se especifican en el Apéndice B, tabla 2.
6. Lavados con PBS + 0,05% Tween-20, 3x10 min.
7. Para visualizar las proteínas reconocidas se utilizó un sistema de detección basado en la incubación de la membrana con los reactivos ECL (Amersham) para *Western Blot*, durante 1 min. a temperatura ambiente y oscuridad.
8. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminó el reactivo ECL de la membrana y se puso ésta sobre una película fotográfica X-OMAT de KODAK en un casete de exposición de autorradiografías, durante un tiempo variable de 2-10 min, de forma que la emisión luminosa impresione la película detectándose la banda o bandas con la intensidad adecuada.
9. En algunos experimentos se escanearon las bandas impresionadas en la película fotográfica mediante un densitómetro (Bio-Rad GS 800) para su posterior análisis mediante el software *Quantity one* (Bio-Rad). Dicho programa nos permitió determinar valores de  $M_r$ ,  $pI$  así como detectar variaciones de densidad óptica en el área ocupada por las bandas de distintos ensayos.

El  $pI$  de las proteínas se calculó según su posición en el gradiente de pH de tres experimentos independientes, comprobando siempre mediante marcadores comerciales que los gradientes efectivamente se extendían linealmente entre 3-10.

## **2.6. Tinción de geles con azul de Coomassie**

Se siguió el siguiente protocolo:

1. Lavado del gel en agua bidestilada durante 5 min.
2. Fijación en fijador de geles (Apéndice A, tabla 14) durante 30 min.

3. Tinción con azul de Coomassie (Apéndice A, tabla 15) durante 30 min.
4. Lavado del gel con solución de desteñir geles (Apéndice A, tabla 7).
5. Una vez desteñado, se conserva en acético al 10% al menos 30 min.
6. Lavado en agua bidestilada durante 5 min. y estabilización del gel en 10% glicerol 2 x 20 min. El gel se puede entonces deshidratar para su conservación.

## **2.7. Tinción de geles con plata**

Se siguió el siguiente protocolo:

1. Fijación en fijador de geles (Apéndice A, tabla 14) 30 min-1 h.
2. Incubación en solución de incubación (5% etanol, 1% acético) 30 min-noche.
3. Lavados en agua bidestilada 3 x 5 min.
4. Incubación en solución de revelado (0,05% nitrato de plata, formaldehído fresco 20%) en oscuridad durante 15 min, controlando la reacción.
5. Interrupción de la reacción con 5% acético cuando la tinción es la adecuada.
6. Lavados en agua bidestilada 3 x 5 min. y estabilización del gel en 10% glicerol 2 x 20 min. A continuación se puede deshidratar el gel para su conservación.

## **2.8. Inmunoprecipitación de proteínas**

La inmunoprecipitación de proteínas se realizó mediante el siguiente protocolo:

- Resuspensión de una fracción de núcleos aislados en medio DB que contiene 0,5% TX-100 durante 15 min. en agitación en cámara fría.
- Centrifugación a 3.000 rpm 10 min. a 4° C, desechando el sobrenadante.

- Resuspensión del sedimento en 200 µg/ml DNasa I libre de RNasa diluida en medio DB e incubación en agitación durante 1h en cámara fría. Añadir a continuación 1 M sulfato amónico disuelto en DB hasta alcanzar una concentración 0,25 M e incubar 1h en las mismas condiciones.
- Centrifugación a 3.500 rpm 15 min. a 4° C, descartando esta vez el sedimento.
- Añadir al sobrenadante (S2) el anticuerpo primario incubando en agitación y cámara fría durante 2h. A continuación, añadir 25 µl de Proteína-A-Agarosa (Amersham) por cada 200 µl de muestra, incubando en las mismas condiciones 2h adicionales.
- Centrifugación a 10.000 rpm 2 min., descartando suavemente el sobrenadante y lavando el precipitado en DB dos veces más.
- Tras la última centrifugación se solubiliza el inmunoprecipitado en medio de disociación 2x que contiene SDS y mercaptoetanol (Apéndice A, tabla 5), hirviendo la muestra durante 5 min. En ella quedarán disueltas las proteínas immuno-precipitadas, la proteína A y las cadenas pesadas y ligeras de las IgGs de los sueros. Se separan entonces todas las proteínas mediante SDS-PAGE para su posterior análisis o inmunodetección.

### 3. ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN

#### 3.1. Defosforilación *in vitro* de la fracción F2 con Fosfatasa Alcalina

El protocolo de extracción de matrices nucleares se utilizó hasta obtener la fracción F2, que fue resuspendida en 100 µl de medio DB (que contenía 100 mM dietilamina pH 9,9) y al que se le añadieron 4, 18, 36 y 54 unidades de fosfatasa alcalina (FA) de intestino de ternera (Roche). Se incubaron a 35°C durante 1h. Se utilizaron como control la reacción sin FA o con el enzima inactivado (hervido). Tras la incubación las muestras se diluyeron en medio DB frío y se añadió gota a gota 4M NaCl en DB hasta alcanzar una concentración final de 2M, incubando durante 15 min. en hielo. Se centrifugó a 3.500 rpm 15 min. recogiendo el sobrenadante y el sedimento de cada ensayo para el posterior análisis de la variación de densidad óptica de las bandas reconocidas por el suero. Los valores

medios y su desviación estándar se calcularon a partir de tres experimentos independientes.

### **3.2. Fosforilación de la matriz nuclear con Caseína Kinasa CK2**

Los ensayos de fosforilación se realizaron en muestras de 50  $\mu$ l que contenían 20  $\mu$ g de fracción MN, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M ATP y 500 unidades de Caseína Kinasa CK2 comercial (New England Biolabs). La muestra control carecía de CK2. Todas las muestras se incubaron durante 1 h a 30° C, y a continuación las proteínas se separaron en geles de acrilamida al 8-10% y se analizaron mediante inmunodetección en membrana con el suero correspondiente. La detección de fosfoproteínas en la MN se realizó mediante incorporación de  $\gamma$ - $^{32}P$ , por lo que a cada muestra (incluido el control) se añadieron 10  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]-ATP. La co-localización de la proteína detectada por el suero y una de las proteínas fosforiladas mediante CK2 se realizó comparando las películas impresionadas de la inmunotransferencia (expuesta 5 min) y la autoradiografía de la misma membrana (expuesta 24-48 h).

### **3.3. Inhibición / estimulación de la CK2 endógena**

#### **3.3.1. Inhibición de la CK2**

Se incubaron núcleos recién aislados en medios de reacción (50 mM Hepes; 150 mM NaCl; 10 mM  $MgCl_2$ ; 1 mM PMSF; 2 mg / ml aprotinina) con 100, 200, 300 y 400 nM heparina, un inhibidor específico de la CK2, durante 1 h a 35°C. En el tubo control no se añadió heparina. A continuación se realizó el protocolo habitual de extracción de MNs con alta fuerza iónica (Apartado 1.2. de Material y Métodos), añadiendo en todos los medios utilizados durante la extracción la concentración de heparina correspondiente en cada ensayo -exceptuando el control-, para evitar que el efecto de la droga revirtiera durante el tiempo que dura la extracción. Finalmente, se analizaron los sobrenadantes S3 para calcular las cantidades relativas de la proteína detectada por el suero en cada ensayo.

### **3.3.2. Estimulación de la CK2**

Se incubaron núcleos aislados frescos en 1 mM espermina y 2 mM espermidina (estimuladores de CK2) diluidas en medio CSK (Apéndice A, tabla 2) a temperatura ambiente durante 5, 10, 15 ó 20 min. La reacción control consistió en la incubación de una muestra nuclear durante 20 min. en medio CSK sin espermina ni espermidina. Se analizaron los sobrenadantes S3 para calcular las cantidades relativas de la proteína detectada por el suero en cada ensayo.

En ambos casos las proteínas de las fracciones S3 se separaron mediante SDS-PAGE y transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Previamente a la incubación con el suero, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau al 2% para confirmar que cada carril contenía la misma cantidad de proteína, utilizando las variantes de la histona H1 como control de carga en el densitómetro.

### **3.4. Análisis estadístico**

Los ensayos con FA e inhibición-estimulación de la CK2 endógena se basaron en la detección de variaciones en la densidad óptica (D.O.) y el área (mm<sup>2</sup>) de las bandas detectadas por el suero escaneadas densitométricamente. Los datos originales de tres experimentos independientes se utilizaron para hacer los distintos gráficos. Se utilizó un diseño en bloque para detectar variaciones significativas entre las medias de los experimentos y los datos se analizaron mediante ANOVA seguido de un test de Newman-Keuls.

## **4. INMUNOFLUORESCENCIA (IF)**

### **4.1. Núcleos aislados y fracciones subnucleares**

#### **4.1.1. Preparación de las muestras**

Los sedimentos de centrifugación correspondientes a las distintas fracciones se fijaron con 2% paraformaldehído (PFA) en PBS pH 7,4 y 0,5% TX-100 recién preparado durante 30 min. en hielo. Se eliminó el fijador por centrifugación, y se lavaron con PBS 3x15 min., centrifugando cada vez. Para preparar el fijador se calentó el PBS pH 7,4 a 60° C y se añadió el PFA, formándose una suspensión lechosa que tras un periodo de agitación se torna cristalina. Una vez atemperado se añadió 0,5% TX-100 y se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m.

#### **4.1.2. Reacción en suspensión**

Las incubaciones se realizaron en tubos conteniendo las fracciones celulares y en agitación para favorecer la penetración de los sueros. Las muestras ya marcadas se depositaron sobre los pocillos de un portaobjetos, donde se realizó la tinción con DAPI.

El protocolo fue el siguiente (a menos que se especifique, todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente en un agitador circular en movimiento):

- Los núcleos aislados o las fracciones subnucleares se resuspendieron en 200  $\mu$ l de 2% PFA en PBS + 0,5% Triton X-100 y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Antes de centrifugar a 3.000 rpm 15 min. se añadió PBS hasta completar 1ml.
- Se resuspendió bien el sedimento y se lavó otros 15 min. en 1ml de PBS + 0,5% TX-100, centrifugando después.
- Se resuspendió bien el sedimento en 200  $\mu$ l de 20 mM glicina en PBS durante 15 min. Antes de centrifugar a 3.000 rpm 15 min. añadimos PBS + 0,05% Tween-20 hasta completar 1ml.



- Se resuspendió bien el sedimento en solución de bloqueo (PBS + 0.05% Tween-20 + 2% de BSA), incubando 30 min. A continuación y sin centrifugar, se puede añadir el anticuerpo primario o suero preinmune hasta alcanzar la concentración adecuada e incubar 1 hora o toda la noche, a 4°C en este último caso.
- Se añadió PBS +0,05% Tween-20 hasta completar 1 ml y se lavó 15 min. antes de centrifugar.
- Se resuspendió bien el sedimento en PBS +0,05% Tween-20 y se incubó 20 min. antes de centrifugar.
- Se resuspendió bien el sedimento en PBS +0,05% Tween-2 que contenía el anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo, incubándose 45 min. en oscuridad.
- Se añadió PBS +0,05% Tween-20 hasta completar 1 ml y se lavó 15 min. en oscuridad antes de centrifugar.
- Se lavó otra vez el sedimento durante 20 min. en oscuridad y se centrifugó, resuspendiéndolo después bien en un volumen adecuado de PBS de modo que la suspensión quede ligeramente turbia. A continuación se depositaron alícuotas de 5-10 µl de cada muestra sobre los pocillos del portaobjetos, dejando secar en oscuridad.
- Una vez seco se tiñó eventualmente con DAPI y se montaron las preparaciones como en el apartado 4.2.2.

Es importante filtrar todos los medios a través de un tamaño de poro de 22 µm para evitar contaminaciones bacterianas. Las preparaciones se pueden observar directamente o guardar a 4°C en oscuridad para su posterior observación.

## 4.2. Células enteras

### 4.2.1. Preparación de muestras de aplastados celulares

Los meristemos radiculares se fijaron en 2% PFA en tampón PBS pH 7,4 con 0,5% TX-100 durante 1h a temperatura ambiente y se lavaron en PBS 3x10 min. Entonces se digirieron las raíces con un cóctel de enzimas de 1% Pectinasa (Serva), 2% Celulasa R10 (Serva), 0,5% Macerozima R10 (Serva) y 0,4 M Manitol (Merck) en PBS pH 7,4 durante 30-45 min. a 37°C, se lavaron en PBS 2 x 15 min, dejando la muestra en el último lavado toda la noche a 4°C. Al día siguiente se trocearon y aplastaron los meristemos sobre los pocillos del portaobjetos, golpeando suavemente un cubreobjetos circular sobre la muestra y retirando los residuos sólidos. Se dejaron secar los portaobjetos al aire, conservándolos a -20°C hasta su uso.

### 4.2.2. Reacción inmunológica

*Bloqueo de grupos aldehídos:*

1. Incubación de las muestras 2x15 min. en 20 mM Glicina en PBS.
2. Lavado con PBS + 0,05% de Tween-20 durante 10 min.

*Permeabilización de las muestras:*

3. Permeabilización con PBS +0,5-1% TX-100 durante 30 min. a temperatura ambiente.
4. Incubación en solución de bloqueo (PBS + 0,05% Tween-20 + 2% de BSA) durante 30 min. a temperatura ambiente.

*Incubación de anticuerpos:*

5. Incubación de las muestras con 10-20  $\mu$ l de anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo en cámara húmeda durante 1h a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C.
6. Lavado de los pocillos con PBS + 0,05% Tween-20, dejándolos cubiertos con dicha solución 3x15 min. a temperatura ambiente.
7. Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo en solución de bloqueo, 1 h en oscuridad a temperatura ambiente.
8. Lavados en PBS + 0,05% Tween-20, 3x10 min.
9. Tinción de contraste de los pocillos que contengan núcleos o cloroplastos con 1  $\mu$ g / ml DAPI 5 min, a temperatura ambiente y en oscuridad, para visualizar el ADN.
10. Para evitar que la fluorescencia decayera rápidamente se montaron las preparaciones en un medio anti-fading (Vectashield). Posteriormente se sellaron con un cubreobjetos y esmalte de uñas, dejándolas secar en oscuridad.

#### **4.3. Observación, controles y análisis estadístico**

La reacción se controló con un microscopio de fluorescencia Zeiss standard.

Las muestras fueron analizadas mediante un Microscopio Confocal Ultraespectral Leica TCS-SP2-AOBS-UV con rango de excitación ultravioleta y visible. Para cada muestra se tomaron una serie de secciones ópticas separadas cada 0,3-0,5  $\mu$ m. Las imágenes fueron sometidas a la acción de un filtro Kalman y se grabaron a baja velocidad a una resolución de 1024 x 1024 pixels. En estas condiciones obtuvimos imágenes con una buena relación señal-ruido. En todos los casos el barrido fue aumentado a una media de zoom 2x para el objetivo de 100x, ó 4x para el objetivo de 63x. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software de Leica y el programa Adobe PhotoShop 5.5. Finalmente fueron

impresas en una impresora HP-1120 de inyección de tinta de color a su máxima resolución.

Como controles se incubaron las muestras sin anticuerpo primario o con los sueros preinmunes, sin variar el resto de las condiciones.

El efecto de las características celulares y el tejido vegetal sobre el número de cuerpos nucleares fue analizado por medio de la prueba Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn (Dunn, 1964), para determinar la existencia de diferencias significativas. Cuando fue necesaria la comparación de proporciones, como en el caso de núcleos y matrices nucleares marcadas y no-marcadas con el suero 288, ésta se llevó a cabo por medio de la prueba de Chi-cuadrado. En dichas comparaciones el número de grados de libertad fue igual a 1, y se aplicó la corrección de Yates.

## **5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN E INMUNOMARCADO CON ORO**

### **5.1. Preparación de las muestras**

#### **5.1.1. Fijación**

Las diferentes muestras, como segmentos de raíces u hojas, sedimentos de matrices nucleares aisladas o protoplastos de hoja de tabaco, se fijaron en una solución recién preparada de PFA 2% en PBS pH 7,4 durante 1h en hielo, y se lavaron posteriormente con PBS 3x10 min.

#### **5.1.2. Deshidratación, infiltración e inclusión en LR White**

- *Deshidratación*

Una vez fijadas las muestras, se sometieron a un proceso de deshidratación en una serie de alcoholes:

Etanol al 30%	30 min	4°C
Etanol al 50%	30 min	4°C
Etanol al 70%	Noche	4°C
Etanol al 90%	1 hora	4°C
Etanol al 100%	45 min	4°C
Etanol al 100%	45 min	4°C
Etanol al 100%	45 min	4°C

- *Infiltración e inclusión en resina*

Se utilizó la resina comercial LR White (London Resin), que viene directamente preparada para su uso.

La infiltración se llevó a cabo en tres fases, con mezclas que contenían concentraciones crecientes de resina en alcohol:

Etanol al 100%:LR White 2:1 ..... 1 h y 30 min, 4°C.

Etanol al 100%:LR White 1:2..... 1 h y 30 min, 4°C.

LR White ..... 3-4 días, se cambia tres veces por día.

La inclusión se realizó utilizando cápsulas de gelatina. Las muestras se depositaron en el fondo y se cubrieron con resina hasta llenarlas totalmente. Se taparon y se introdujeron en una estufa a 60°C durante 20-22 horas para su polimerización.

### 5.1.3. Ultramicrotomía

Se seleccionaron las zonas de interés en los diferentes bloques de inclusión mediante cortes semifinos obtenidos en un PYRAMITONE LKB 11.800, observados en microscopía de fase, y se tallaron las pirámides correspondientes conteniendo las zonas seleccionadas en el mismo equipo.

Una vez talladas las piezas se obtuvieron cortes ultrafinos de entre 80-100 nm mediante una cuchilla de diamante Drukker International en un ultramicrotomo REICHERT ULTRACUT, recogiendo los sobre rejillas de níquel de 100 cuadrículas recubiertas con una película de 0.50% de solución de formvar en dicloroetileno (TAAB). Estas últimas se habían preparado previamente tras flotar sobre agua filtrada una película de solución de formvar, sobre la que se dispusieron las rejillas y un papel de filtro, que se sacó del agua y volteó con cuidado. Sobre el papel se quedan pegadas las rejillas de níquel recubiertas con la película de formvar.

### 5.2. Inmunomarcado con oro

Se utilizó una técnica indirecta. Tras incubar con los sueros que reconocían específicamente los epítomos sobre la superficie del corte, éstos fueron reconocidos por un anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 10 nm de diámetro. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente y flotando las rejillas sobre gotas de las distintas soluciones utilizadas, con la cara de los cortes en contacto con la gota, mediante el siguiente protocolo:

#### *Bloqueo de grupos aldehídos*

1. Flotación de las rejillas 15 min. sobre 20 mM glicina en PBS.

#### *Reacción de inmunodetección*

2. Lavado de las muestras con PBS + 0,05% Tween-20 durante 10 min.

3. Incubación en solución de bloqueo (PBS + 0,05% Tween-20 + 2% de BSA) 30 min.
4. Incubación con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
5. Lavados con PBS + 0,05% Tween-20, 3 x 10 min.
6. Incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con oro coloidal, y diluido en solución de bloqueo durante 1 h.
7. Lavados con PBS + 0,05% Tween-20, 3 x 10 min.

*Contrastación de los cortes con acetato de uranilo y citrato de plomo*

8. Lavados con agua bidestilada, 3 x 10 min.
9. Las rejillas se dejan secar sobre un papel de filtro durante 10 min. y se contrastan con acetato de uranilo al 5% en agua bidestilada (previamente centrifugado durante 30 min. a 1000 rpm), en oscuridad, durante 30 min.
10. Lavados con agua bidestilada, 3 x 10 min.
11. Una vez secas las rejillas, se dejan secar sobre un papel de filtro durante 10 min. y se contrastan con citrato de plomo al 0,4% en agua bidestilada, previamente centrifugado durante 5 min. a 1000 rpm, durante 1-2 min.
12. Lavados con agua bidestilada, 3 x 10 min.

Los controles fueron incubados con los sueros pre-inmunes y/o con tan solo el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal.

Las muestras se observaron en microscopios electrónicos de transmisión modelos Philips 300 y Jeol 1230 normalmente a 80 KV. Las correspondientes fotografías se tomaron automáticamente, y sus negativos se escanearon en un escáner AGFA *snapscan*-1236. Las imágenes se procesaron mediante el programa Adobe PhotoShop 5.5. y se imprimieron mediante una impresora HP 1200.

## 6. CITOMETRÍA DE FLUJO

El análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo utilizando el protocolo desarrollado por Pelayo y colaboradores (2001) para *A. cepa*. Los meristemas celulares fueron sincronizados según lo descrito anteriormente.

1. Los segmentos de raíces se fijaron en 2% PFA en medio Tris-salino pH 7,5 (Apéndice A, tabla 16) conteniendo 0,1% TX-100 durante 20 min. en hielo.
2. Tras la fijación se lavaron 3 x 10 min. en medio Tris-salino y se homogeneizaron en el Ultra-Turrax en medio de lisis pH 7,5 (Apéndice A, tabla 17).
4. El homogeneizado se filtró a través de una malla de nylon de 30  $\mu$ m y se centrifugó a 600 g durante 20 min. a 4° C, resuspendiendo en 500  $\mu$ l de medio de lisis. Las muestras se mantuvieron a 4° C hasta su análisis en el citómetro.
5. Inmediatamente antes del análisis en el citómetro, las muestras se incubaron 30 min. en 30  $\mu$ g / ml de RNasa (Boehringer-Mannheim) y se tiñó su ADN con 100  $\mu$ g / ml ioduro de propidio (Sigma) durante al menos 5 min.

Para el análisis de las muestras se utilizó un citómetro de flujo EPICS XL equipado con un láser de argón de 488 nm. La señal del ioduro de propidio se recogió mediante un filtro de paso de banda de 620 nm.

## 7. CLONACIÓN DE *AcMFP1* A PARTIR DE UNA GENOTECA DE cDNA DE *A. cepa*

Se intentó la clonación de *AcMFP1* a partir de una genoteca normalizada construida a partir de cDNA de raíces, bulbos y hojas de cebolla, facilitada por el Dr. Michael J. Harvey, Universidad de Wisconsin, EEUU. La clonación se abordó mediante dos técnicas distintas: PCR e hibridación de colonias.



## 7.1. Rastreo de la genoteca mediante PCR

### 7.1.1. Selección de los cebadores específicos

Se alinearon todas las secuencias conocidas de cDNA de MFP1. Tres dicotiledóneas: AtMFP1, LeMFP1, NtMFP1-1 y NtMFP1-2 (*Arabidopsis*, tomate y tabaco, respectivamente) y cuatro monocotiledóneas (maíz, arroz, trigo y *Hordeum*). Se seleccionaron entonces las tres regiones más conservadas entre todas las secuencias de la parte C-terminal de la proteína. Los nucleótidos que no coincidían en todos los casos se seleccionaron en función del nucleótido mayoritario de todas las especies, o en su caso el de las monocotiledóneas (como *A. cepa*) *Hordeum* y arroz. Así, se seleccionaron tres cebadores o *primers*, uno para amplificar en sentido 5' (GAG AGA GAA GTG CTC TCA AA) y dos en sentido 3' (CGC AAC ATC TCA CCC TTT GCT y TTT GCT AAC GCC AAT TCC TCT TC), todos con una temperatura de anillamiento similar.

### 7.1.2. PCR y clonación de fragmentos amplificados

Los vectores (pCMV-SPOT6) contenían los distintos insertos de cDNA de cebolla entre los sitios de restricción *Not* I (extremo poli-dA) y *Eco* RV, estando flanqueados además por los *primers* M13 (*Forward* y *Reverse*) y los promotores T7 y SP6. Los plásmidos fueron purificados mediante un kit comercial (Plasmids MiniPrep, QIAGEN). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer 9.600) en las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización durante 2 min. a 96° C seguido de 30 ciclos de 95° C-45 sg / 50-55° C-45 sg / 72° C-90 sg y un último ciclo de extensión de 5 min. a 72°C. Las bandas más intensas se eluyeron de los geles de agarosa y se purificaron de acuerdo a lo descrito por Sambrook y colaboradores (1989):

- Se diluyó el volumen de la muestra hasta 0,5 ml, para minimizar la pérdida de ADN en el pipeteo, y se añadieron 0,5 ml de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), agitando en vortex durante 2 min. si el ADN era menor de 10 Kb y centrifugando a 12.000 rpm 5 min.

- Se eliminó el fenol lavando con cloroformo en la proporción 3 volúmenes muestra: 1 volumen cloroformo, se agitó en vortex 2 min. y se centrifugó.
- Se precipitó el ADN añadiendo a 1 volumen de muestra 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M. Se agitó suavemente y se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  de 30 min. a toda la noche. Después se centrifugó y resuspendió el ADN en agua, conservándolo a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las bandas eluidas, o en ocasiones el producto total de PCR, se clonaron mediante el kit comercial en el plásmido PCRII-TOPO (Stratagene). Las colonias TOP10' transformadas se seleccionaron mediante X-gal en dimetilformamida (DMF), se purificaron sus plásmidos y se analizaron sus insertos mediante enzimas de restricción. Los insertos seleccionados se secuenciaron y se compararon sus secuencias con las existentes en el NCBI.

## **7.2. Hibridación de colonias con sondas de cDNA de MFP1**

### **7.2.1. Preparación de las sondas**

Las sondas elegidas fueron fragmentos de cDNA de 0,6-1Kb correspondientes a la zona C-terminal de MFP1 de *Arabidopsis*, tabaco, tomate y maíz. Las sondas se prepararon mediante amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA en presencia de  $[\alpha^{32}]\text{-dATP}$ .

### **7.2.2. Hibridación sobre colonias (Southern)**

#### **• Preparación de las colonias sobre membranas de nylon**

- Se prepararon placas de LB+antibiótico ( $\phi=11\text{cm}$ ) sobre las que se extendieron unas 6.000 colonias de la genoteca, dejándolas a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

- Al día siguiente se colocó suavemente un filtro de nylon sobre las colonias de cada placa, y se dejó 1 min. durante el que se realizaron marcas identificativas de su posición.
- Se levantó suavemente este filtro-réplica y se depositó 2 min. sobre un papel mojado en medio de desnaturalización de ADN (0,5 M NaOH; 1 M NaCl). La placa se volvió a incubar a 37° C durante 4h, conservándola después a 4° C.
- Se cambió el filtro-réplica a un segundo papel mojado en medio de neutralización (1 M Tris-HCl pH 7,4; 1 M NaCl) donde se dejó 2 min.
- Se lavó el filtro-réplica en un gran volumen de SSC 2x al que se le añadió 0,1% SDS, se secó suavemente el filtro y el ADN desnaturalizado de las colonias se fijó al filtro de nylon exponiéndolo a luz UV (Stratalinker).

#### • Incubación

- Las membranas del filtro-réplica se pre-incubaron a 50° C durante 45 min. en medio de hibridación (250 mM Church buffer; 1% seroalbúmina bobina; 1 mM EDTA; 7% SDS).
- Se desnaturalizaron las sondas hirviéndolas durante 5 min. pasándolas inmediatamente a hielo y diluyendo en medio de hibridación nuevo. Se incubó durante toda la noche a 50° C en agitación.
- Se lavaron los filtros-réplica en SSC 2x; 0,1% SDS durante 30 min. comprobando a partir de entonces la radioactividad emitida hasta que el lavado parecía óptimo, exponiéndose la película en un casete de 6-24h a -80° C.

Una vez seleccionadas las señales radioactivas más prometedoras se identificaron las colonias correspondientes en la placa y se realizó una segunda vuelta de todo el proceso. Cada colonia seleccionada se inoculó en LB+ antibiótico y se volvieron a extender unas 600 colonias por placa. Esta vez los filtros-réplica se incubaron con las sondas a 55° C toda la noche. Se realizó una tercera vuelta con las colonias seleccionadas de la segunda vuelta, esta vez incubando con cada sonda por separado, para detectar los distintos grados de reconocimiento. De las colonias seleccionadas se purificaron los plásmidos y se secuenciaron los insertos de cDNA de cebolla.

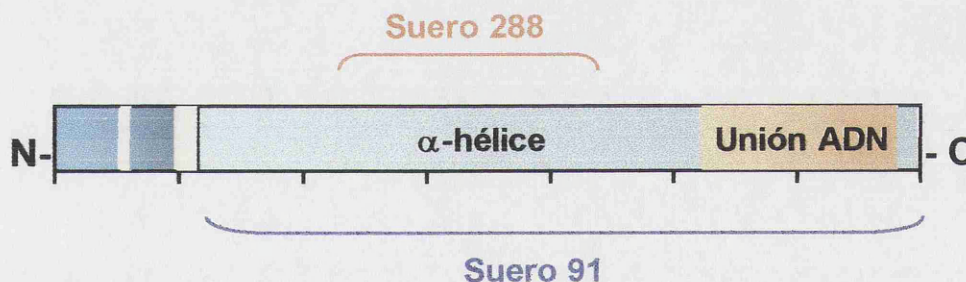
RESULTADOS

# 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECONOCIDAS POR LOS SUEROS ANTI-MFP1 EN CÉLULAS PROLIFERANTES DE LA RAÍZ DE CEBOLLA

## 1.1. Caracterización mediante inmunodetección en membrana

### 1.1.1. Suero anti-MFP1 de tomate (288)

La presencia y solubilidad de las proteínas antigénicamente relacionadas con MFP1 se analizó en núcleos aislados y en las sucesivas fracciones obtenidas durante la preparación de MNs de cebolla (Fig 4) mediante inmunodetección en membrana. Para ello se utilizaron sueros desarrollados contra distintos dominios de las proteínas de tomate y *Arabidopsis* (Fig 5).



**Figura 5. Dominios de MFP1 utilizados en la producción de los sueros 288 y 91.**

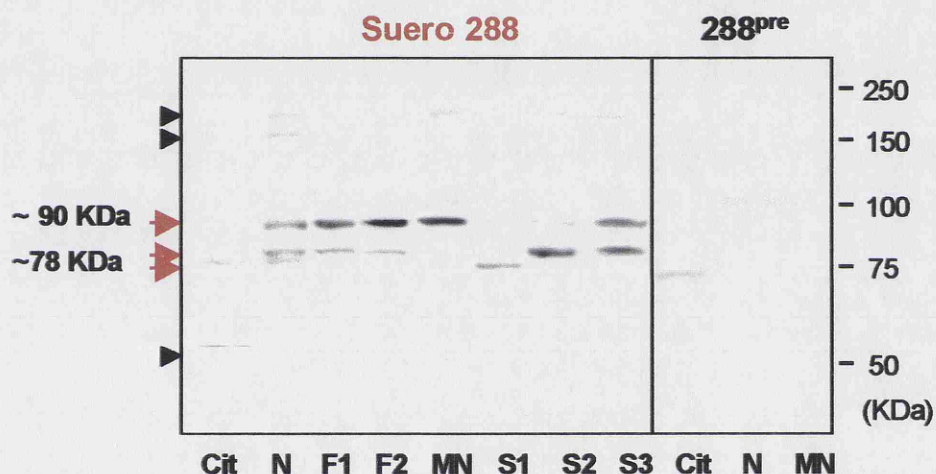
El suero 288 se desarrolló contra el fragmento central del dominio  $\alpha$ -hélice comprendido entre los aminoácidos 236-432 de LeMFP1. Para la producción del suero 91 se utilizó toda la proteína AtMFP1, a excepción del dominio N-terminal que contiene las regiones hidrofóbicas conservadas en otras proteínas.

El suero 288 desarrollado contra el fragmento central en  $\alpha$ -hélice reconoció tres bandas principales (una banda y un doblete) en fracciones de núcleos aislados, a concentraciones en las que el suero preinmune no daba reacción (Fig 6). Sus movilidades electroforéticas relativas ( $M_r$ ) en geles de acrilamida al 8% fueron de aproximadamente 90 KDa para la banda única y de 78 KDa ( $\pm 2$  KDa) para el doblete, coincidiendo éste último con la  $M_r$  descrita para MFP1 en otras especies vegetales (Harder *et al*, 2000). La banda superior del doblete no se había detectado en estudios anteriores, ya que el suero 288 del primer sangrado



del animal sólo detectaba la banda inferior del mismo (Samaniego *et al*, 2001; Samaniego, 1999), por lo que la banda superior de 78 KDa sólo se puso en evidencia con los sueros 288 de sangrados posteriores.

El suero 288 también detectaba dos bandas débiles de aproximadamente 160 y 210 KDa, ésta última presente en la fracción de MNs (Fig 6). La de 160 KDa corresponde a una forma polimerizada de la proteína de la banda superior de 78 KDa, como se demostró al desnaturalizar con urea, calor y concentraciones más altas de SDS, como se verá más adelante.



**Figura 6. Identificación de las bandas de MFP1 de *A. cepa* con el suero 288, y detección de las mismas en las fracciones subcelulares obtenidas durante la preparación de matrices nucleares.**

Inmunodetección en membrana con el suero anti-LeMFP1 (288) y su suero pre-inmune (288<sup>pre</sup>) en las fracciones Cit, N, F1, F2, MN, y los sobrenadantes S1, S2, S3. Las flechas rojas indican las bandas específicas principales.

El suero detectó otras bandas que podrían corresponder a reacciones cruzadas con proteínas con dominios conservados, o bien a fragmentos proteolíticos de las proteínas de 78 y 90 KDa, ya que son bandas de menor Mr no reconocidas por el suero preinmune. Ninguna de ellas se localizó en el rango de Mr descrito para los homólogos de MFP1 (Harder *et al*, 2000), incluyendo una intensa banda de aproximadamente 55 KDa detectada en las fracciones citoplasmática y ocasionalmente en el sobrenadante S1 (Fig 6).

La banda principal de 90 KDa no se detectó en la fracción *citoplasmática*, y una proporción muy baja de la proteína se extraía con DNasa y sulfato amónico, recuperándose como una banda de poca intensidad en el sobrenadante S2. Una alta proporción de la proteína se extrajo posteriormente con 2M NaCl y se recogió en el sobrenadante S3, aunque otra fracción importante resistía la extracción con alta fuerza iónica y permanecía fuertemente anclada a la MN (Fig 6).

Las proteínas del doblete de 78 KDa presentaban características distintas de solubilidad, y ninguna era un componente de la MN. La banda inferior se detectó en las fracciones *citoplasmática* y nuclear, siendo extraída totalmente del núcleo mediante detergente en el sobrenadante S1. La banda superior es eminentemente nuclear, y no es detectable en el *citoplasma* ni se extrae con detergente, pero sí mediante digestión con DNasa y sulfato amónico, y extracción con alta fuerza iónica, recogándose en los sobrenadantes S2 y S3 (Fig 6).

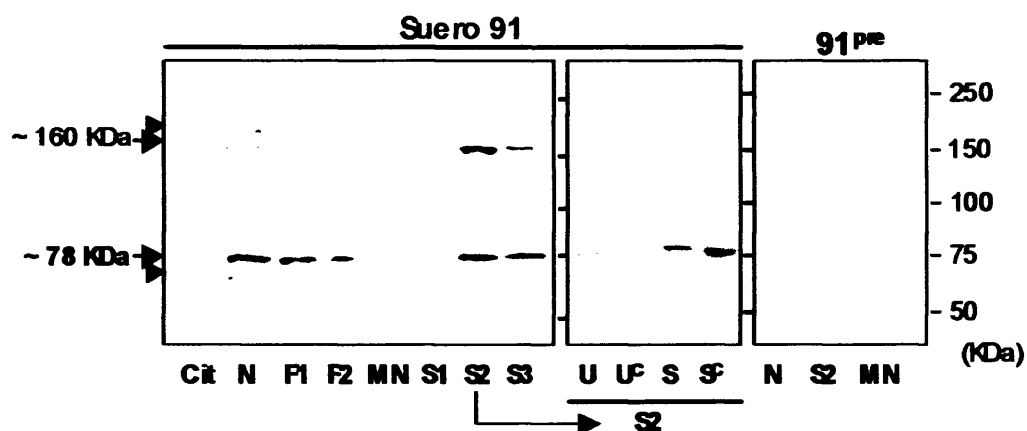
#### **1.1.2. Suero anti-MFP1 de *Arabidopsis* (91)**

El suero 91 se desarrolló utilizando el dominio completo en  $\alpha$ -hélice de AtMFP1, incluyendo el subdominio de reconocimiento de ADN (Fig 5). En un análisis similar al descrito anteriormente, este suero reconoció de forma específica una banda de gran intensidad y tres de menor intensidad en fracciones nucleares de células meristemáticas de raíz, a concentraciones en las que el suero preinmune no daba señal. La de mayor intensidad fue una banda de aproximadamente 78 KDa (Fig 7). Sus características de solubilidad eran similares a las de la banda superior del doblete de 78 KDa detectado con el suero 288; es decir, una parte se extraía y recogía en el sobrenadante S2 junto con el ADN y las histonas, y el resto se extraía mediante 2M NaCl recuperándose en el sobrenadante S3. Esta banda no se detectaba después de la extracción con detergente en el sobrenadante S1 ni en la fracción de MN (Fig 7).

Como en el caso del suero 288, el suero 91 detectaba dos bandas de alto peso molecular de aproximadamente 160 y 210 KDa en los núcleos aislados. La

banda de 160 KDa presentaba la misma intensidad que la de 78 KDa en los sobrenadantes S2 y S3. Para comprobar si esta banda correspondía a una forma polimerizada de la proteína de 78 KDa que no hubiera sido completamente desnaturada, se solubilizaron las proteínas de los sobrenadantes S2, precipitados con TCA, en medios que contenían mayor concentración de SDS (8%) o en presencia de urea 6 M. Al separar las proteínas mediante SDS-PAGE, esta banda desaparecía y el suero 91 reconocía exclusivamente la banda de 78 KDa (Fig 7).

El suero 91 también detectaba una banda de 70 KDa de muy baja intensidad en las fracciones citoplasmática y de núcleos aislados (Fig 7).



**Figura 7. Identificación de las bandas de MFP1 de *A. cepa* con el suero 91, y detección de las mismas en las fracciones subcelulares obtenidas durante la preparación de matrices nucleares.**

Inmunodetección en membrana con el suero anti-A1MFP1 (91) y su suero pre-inmune (91<sup>pre</sup>) en las fracciones Cit, N, F1, F2, MN, y los sobrenadantes S1, S2, S3. Las flechas azules indican las bandas específicas principales. Las bandas de 160 KDa corresponden a formas polimerizadas de las bandas mayoritarias, como se demuestra por su desaparición tras desnaturalización con 6 M urea (U) ú 8% SDS (S), con y sin calentamiento 5 min. a 95° C (U<sup>c</sup>, S<sup>c</sup>).

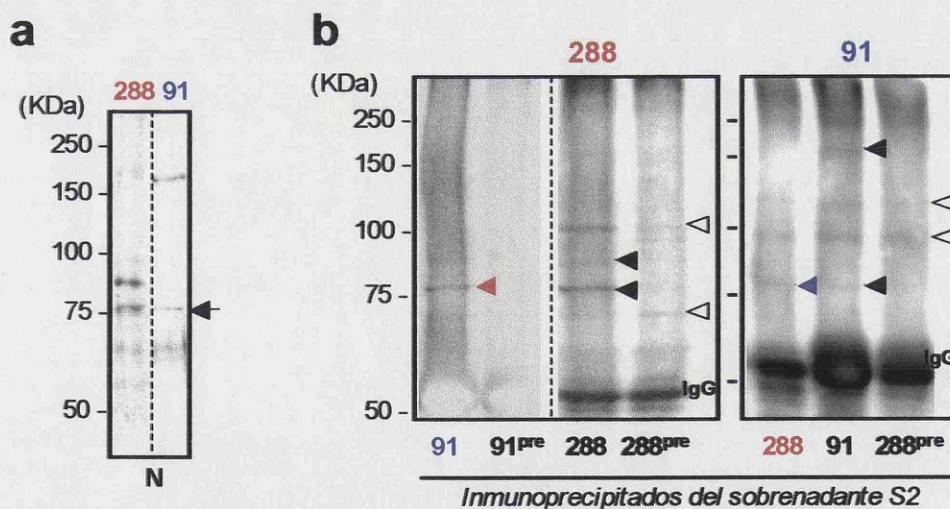
## 1.2. Inmuoprecipitación mediante los sueros 288 y 91

Se comprobó mediante inmunodetección en membrana que el suero 288 reconoce la banda de 78 KDa con mayor intensidad que el suero 91, aunque éste último reconoce más intensamente la forma polimerizada de la proteína en



la banda de 160 KDa (Fig 8 a). Con el objetivo de comprobar si las bandas detectadas por cada suero correspondían a la misma proteína, se inmunoprecipitaron con ambos sueros los sobrenadantes S2, en los que éstas son muy abundantes, y se separaron mediante SDS-PAGE las proteínas inmunoprecipitadas, realizándose a continuación las correspondientes inmunodetecciones directas y cruzadas (Fig 8 b).

Las proteínas inmunoprecipitadas por los sueros 288, 91 y sus correspondientes sueros preinmunes se separaron en geles de acrilamida al 10%. El suero 288 reconoció en su propio inmunoprecipitado la banda de 78 KDa, y ligeramente la de 90 KDa. Ninguna de ellas coincidía con las inmunoprecipitadas por el suero 288 preinmune. El suero 288 reconoció además la banda de 78 KDa en el inmunoprecipitado del suero 91, demostrando que ambos sueros reconocen una misma proteína (Fig 8 b).



**Figura 8. Inmunoprecipitación de las proteínas AcMFP1 con los sueros 288 y 91.**

**(a)** Inmunodetección con los sueros 288 y 91 de proteínas nucleares de una misma fracción nuclear (N). La membrana donde habían sido transferidas se cortó en dos mitades a lo largo del carril de migración, y se incubaron separadamente. Ambos sueros reconocen una banda de 78 KDa (flecha), aunque con distinta intensidad. **(b)** Inmunodetección con los sueros 288 y 91 de las proteínas del sobrenadante S2 inmunoprecipitadas con 288, 91 y los sueros preinmunes 288<sup>pre</sup> y 91<sup>pre</sup>. Se indican: las bandas reconocidas por el mismo suero utilizado en la inmunoprecipitación (flechas negras); la banda de 78 KDa reconocida por el suero 288 en el inmunoprecipitado del suero 91 (flecha roja) y viceversa (flecha azul); las bandas reconocidas por los sueros preinmunes control (flechas blancas); y las correspondientes a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de los sueros (IgG).

De forma similar, el suero 91 reconoció en su propio inmunoprecipitado las bandas esperadas de 78 y 160 KDa, muy abundantes en el sobrenadante S2, que no coincidían con ninguna de las bandas inmunoprecipitadas por el correspondiente suero preinmune. El suero 91 también detectó la banda de 78 KDa en el inmunoprecipitado del suero 288, lo que de nuevo demuestra que ambos sueros reconocen la misma proteína de 78 KDa (Fig 8 b).

El hecho de que la intensidad de la banda de 78 KDa sea menor con el suero 91 que con el suero 288, debido probablemente a una menor reactividad del primer suero (Fig 8 a), dificulta su observación en las membranas de los inmunoprecipitados (Fig 8 b).

Las bandas de 78 y 90 KDa apenas se detectaban mediante tinción con plata en las muestras inmunoprecipitadas más concentradas (no mostrado), lo que indica que no alcanzaban los 10 µg en dichas muestras, imposibilitando su posterior purificación y análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

### **1.3. Asociación de la proteína de 90 KDa a la matriz nuclear**

La proteína de 90 KDa presentaba dos fracciones nucleares distintas, una extraíble mediante alta fuerza iónica (S3) y otra resistente a dicha extracción y por tanto fuertemente unida a la MN (Fig 6). Este comportamiento sugiere que la proteína podría experimentar modificaciones que afecten a su asociación a la MN, lo que es muy frecuente entre las proteínas de la MN. Esta asociación está regulada en numerosas ocasiones mediante fosforilación, como en el caso de las laminas (Gerace y Blobel, 1980), la nucleolina (Gotzman *et al*, 1997), NuMA (Sparks *et al*, 1995), las proteínas remodeladoras de la cromatina (Bérubé *et al*, 2000; Reyes *et al*, 1997; Muchardt *et al*, 1996), etc. La proteína kinasa Caseína Kinasa CK2 está asociada a la MN (Yu *et al*, 2001) y es una de las kinasas que regulan la unión de proteínas a la MN, como en el caso de las proteínas vegetales relacionadas con las laminas (Li y Roux, 1992). La proteína de 90 KDa es reconocida específicamente por el suero anti-LeMFP1, y por lo tanto es un homólogo potencial de MFP1 en cebolla. LeMFP1 es fosforilable por la CK2 (Meier

*et al*, 1996) y posee numerosos sitios específicos de fosforilación para CK2 en su secuencia, dos de ellos conservados en tomate, tabaco y *Arabidopsis* (Jeong *et al*, 2004; Harder *et al*, 2000). Para investigar si la fosforilación era una de las modificaciones que modulaban la asociación de la proteína de 90 KDa a la MN, se analizó el efecto de la defosforilación con Fosfatasa Alcalina y la fosforilación con CK2 exógena y endógena sobre la unión de esta proteína a la MN.

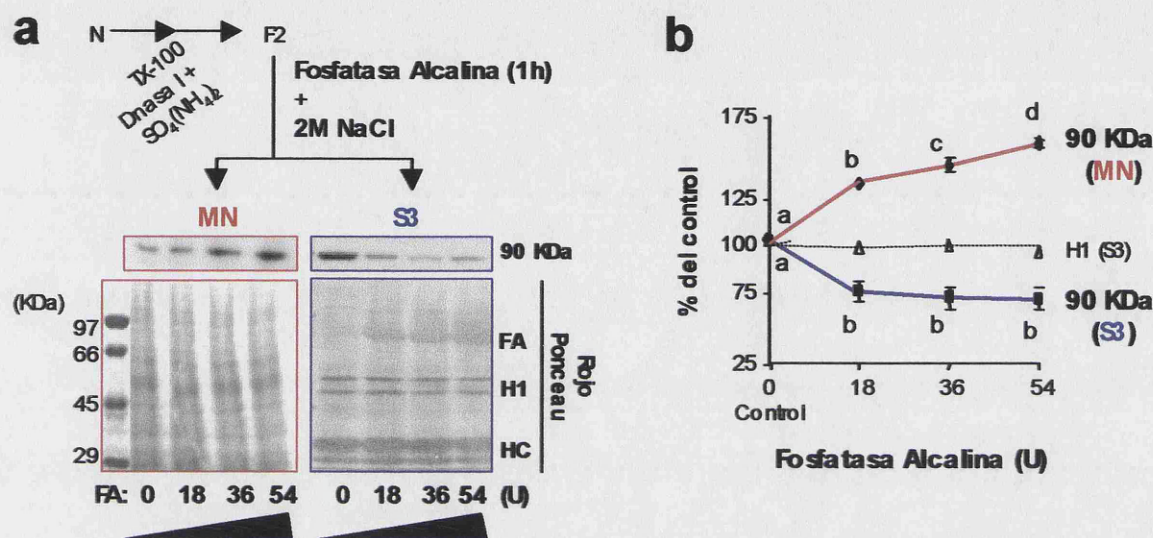
### **1.3.1. Efecto de la defosforilación con Fosfata Alcalina**

Para comprobar si la defosforilación con Fosfatasa Alcalina (FA) afectaba a la extracción de la proteína con alta fuerza iónica de las MNs, los núcleos extraídos secuencialmente con detergente, DNasa y sulfato amónico (fracciones F2) se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de FA (18, 36 y 54 U) durante 1 hora a temperatura ambiente, añadiendo a una de las fracciones medio de reacción sin fosfatasa como control. Tras la incubación se extrajeron las fracciones F2 con 2M NaCl, se separaron mediante SDS-PAGE y se identificaron las bandas con el suero 288 mediante inmunodetección en membrana de las dos fracciones resultantes: soluble (S3) e insoluble (MN). En cada carril se cargaron idénticas cantidades de proteína total, lo que permitía la comparación de las bandas detectadas en cada ensayo (Fig 9 a).

Se cuantificaron películas densitométricamente escaneadas valorando la Densidad Óptica (D.O.) y el área de las bandas, mostrando un enriquecimiento progresivo de la banda de 90 KDa detectada en la MN al aumentar las concentraciones de FA. Así, la cantidad de proteína fuertemente anclada a la MN alcanzaba el 160% del control tras una incubación con 54U de FA, que fue la concentración más alta utilizada (Fig 9 b). La banda de la fracción soluble S3 disminuyó correlativa y progresivamente hasta un 30% en relación con el control (Fig 9 b). Ambas tendencias indicaban que la proteína defosforilada permanecía retenida en la MN, mientras que la proteína fosforilada se extraía mediante alta fuerza iónica.



Como control se cuantificaron las variantes de la histona H1 del sobrenadante S3 en la misma membrana teñida con rojo Ponceau, sin detectar variaciones significativas a lo largo del ensayo (Fig 9 a, b).



**Figura 9. Efecto de la Fosfatasa Alcalina sobre la asociación de la proteína de 90 KDa a la MN.**

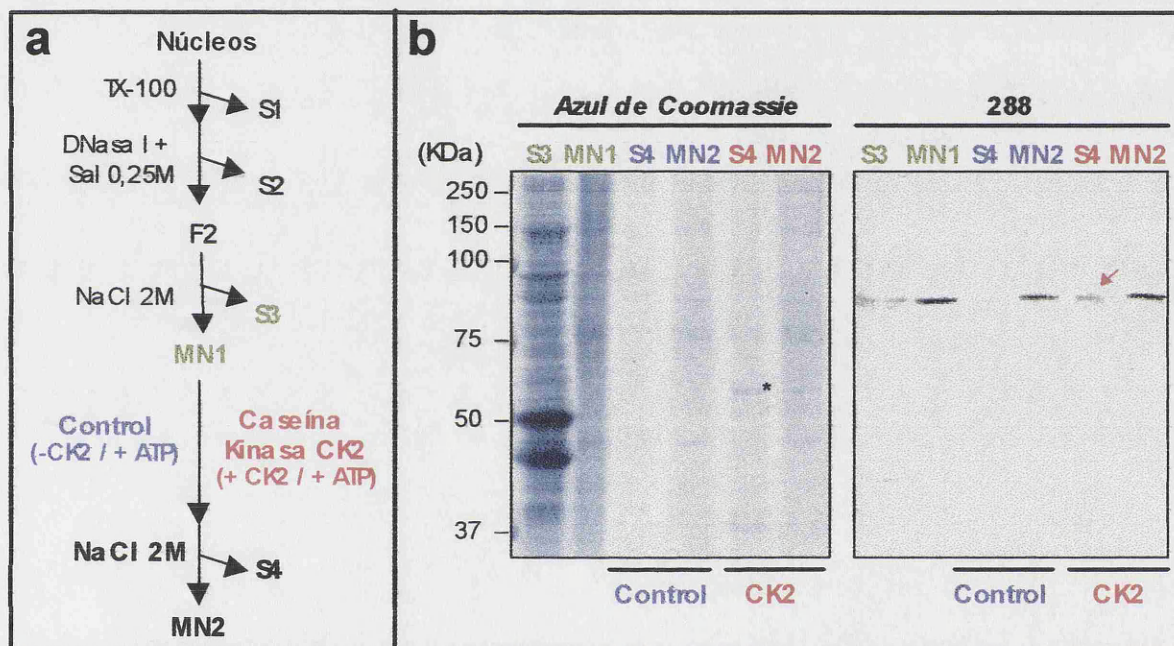
**(a)** Las fracciones F2 de núcleos proliferantes de raíz de cebolla, ver Fig. 1, se trataron con concentraciones crecientes de Fosfatasa Alcalina (18, 36 y 54 U; y 0 U como control) y se extrajeron a continuación con 2M NaCl, recogiendo las fracciones S3 y MN de cada tratamiento. Se muestran las inmunodetecciones de ambas fracciones con el suero 288, y cómo el aumento de la concentración de la FA produce un incremento en la proteína asociada a la MN y un descenso de la que se recupera en el sobrenadante S3. Como control de carga se muestran las mismas membranas teñidas con rojo Ponceau antes de la incubación con el suero. En la membrana de los sobrenadantes S3 se distinguen las cantidades crecientes de Fosfatasa Alcalina (FA) utilizadas en el ensayo, y las cantidades homogéneas de la histona H1 (H1) y del resto de las histonas del core (HC). **(b)** Representación de las medias y desviaciones estándar de los valores de Densidad Óptica x Área (y) de las bandas detectadas con el suero 288 en las fracciones S3 y MN de tres experimentos independientes, frente a los distintos tratamientos con Fosfatasa Alcalina (x). Se incluyen los valores de la histona H1 como control de carga. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar cada valor con el del control (=100%) y el inmediatamente anterior.

### 1.3.2. Efecto de la fosforilación con Caseína Kinasa CK2

Una vez demostrado cuantitativamente que la defosforilación de la proteína de 90 KDa debilita su asociación a la MN, se investigó si la enzima CK2 era capaz de producir el efecto contrario al fosforilar la proteína.



Para ello, las MNs extraídas con 2M NaCl (MN1) se incubaron con CK2 exógena y ATP como fuente de grupos fosfatos. Como control se incubaron MNs (MN1) en las mismas condiciones con ATP, pero sin CK2. Tras 1 hora de incubación se realizó una segunda extracción con 2M NaCl, y las proteínas solubilizadas por la alta fuerza iónica se recogieron en el sobrenadante S4, permaneciendo el resto en la fracción de matrices nucleares doblemente extraídas (MN2) (Fig 10 a).



**Figura 10. Efecto de la Caseína Kinasa CK2 exógena sobre la asociación de la proteína de ~90 kDa a la MN.**

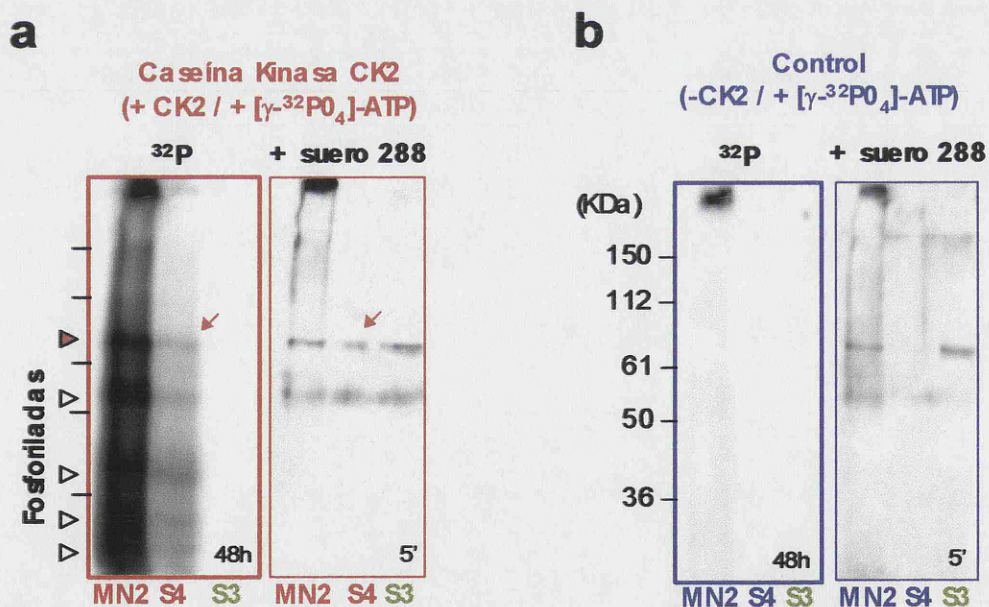
**(a)** Esquema de los ensayos con Caseína Kinasa CK2 y control en núcleos proliferantes de la raíz de cebolla. **(b)** Gel de SDS-PAGE correspondiente a las fracciones analizadas en los ensayos CK2 y controles, teñido con azul de Coomassie. A su lado se muestra la correspondiente membrana de transferencia incubada con el suero 288. La acción de la CK2 exógena (\*) sobre la proteína de 90 kDa en presencia de ATP permite su extracción parcial (flecha) de la matriz nuclear (MN1), y su recogida en el sobrenadante S4. En el ensayo control, realizado en ausencia de CK2 exógena y presencia de ATP, la proteína de 90 kDa resiste la extracción con NaCl permaneciendo fuertemente unida a la matriz nuclear (MN2).

La fosforilación con CK2 facilitó la extracción con NaCl de varias proteínas de la MN, que se recogieron en el sobrenadante S4 y eran detectables con azul de Coomassie, entre ellas la propia CK2. En el sobrenadante S4 del control no se observaron bandas mediante esta tinción (Fig 10 b). Las correspondientes



inmunodetecciones con el suero 288 revelaron que la proteína de 90 KDa se solubilizaba parcialmente después de la fosforilación con CK2, pero no lo hacía en los ensayos control (Fig 10 b).

Para comprobar si la solubilización de la proteína se debía a la fosforilación mediada por la CK2 exógena, o bien correspondía al efecto final de una cadena de modificaciones, repetimos el ensayo utilizando  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  como fuente de grupos fosfato. Se observó que la CK2 incorporaba fosfatos radioactivos en al menos 5 bandas de las fracciones soluble (S4) e insoluble (MN2), tras 48h de exposición de las películas (Fig 11 a). Sin embargo, las fracciones S4 y MN2 control incubadas en presencia de  $^{32}\text{P}$  sin CK2 exógena mostraban una ausencia total de radioactividad, a excepción de la residual del pocillo de aplicación (Fig 11 b).



**Figura 11. Efecto de la Caseína Kinasa CK2 sobre la asociación de la proteína de 90 KDa a la MN: incorporación de  $^{32}\text{P}$  a la proteína.**

Los ensayos son similares a los descritos en la Fig 10a, utilizando esta vez  $^{32}\text{P}$ -ATP radioactivo como fuente de grupos fosfato. **(a)** En presencia de la CK2 exógena se detecta incorporación de  $^{32}\text{P}$  en cinco proteínas de la MN, que son parcialmente extraídas mediante NaCl (cabezas de flecha) y recogidas en el sobrenadante S4. La posición de una de ellas coincide con la de la proteína de 90 KDa detectada con el suero 288 en la misma membrana (flechas rojas). **(b)** El ensayo control se realizó en presencia de  $^{32}\text{P}$ -ATP y ausencia de CK2 exógena, y no se detectó incorporación de  $^{32}\text{P}$  en ninguna proteína. La banda de 90 KDa no se detectó en el sobrenadante S4, sino en las fracciones MN2 y S3.

Incubaciones de las mismas membranas con el suero 288 mostraron la posición coincidente de la proteína de 90 KDa con una de las bandas radioactivas, tanto en MN2 como en S4 (Fig 11 a). Dicha banda estaba ausente en el carril S4 del control (Fig 11 b).

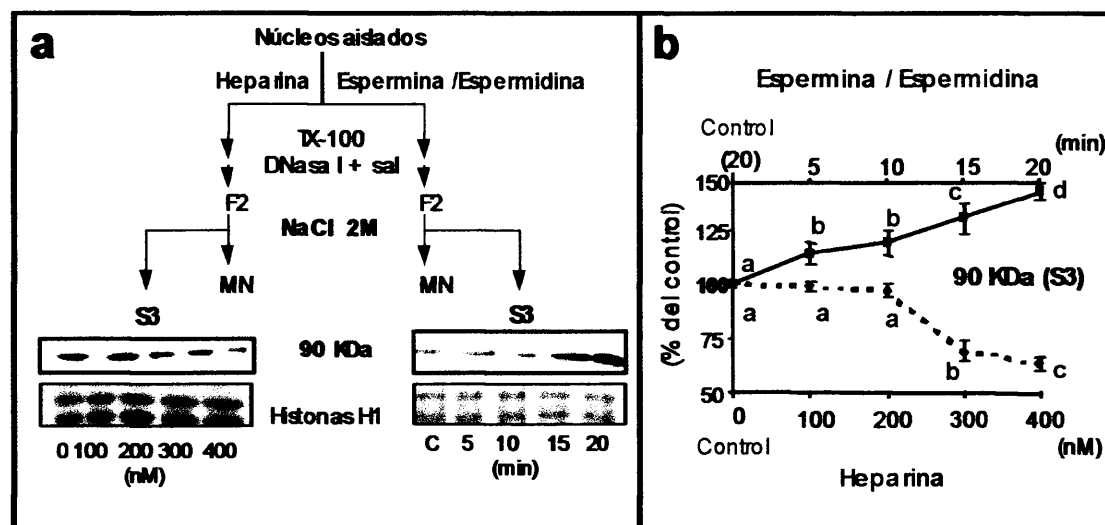
### **1.3.3. Efecto de la estimulación de la CK2 endógena**

Una vez demostrado que la CK2 exógena puede fosforilar la proteína de 90 KDa unida a la MN, posibilitando su posterior extracción con alta fuerza iónica, nos preguntamos si este fenómeno podría ser reproducido por la CK2 endógena. Para ello se usaron policationes como la espermina y la espermidina que estimulan la actividad de la CK2 (Tujera *et al*, 2003; Westmark *et al*, 2002; Li y Roux, 1992), permitiéndonos estimular la actividad de la kinasa endógena de núcleos proliferantes de cebolla y observar su efecto sobre la solubilidad de la proteína de 90 KDa durante la extracción de MNs.

Se incubaron volúmenes idénticos de fracciones nucleares con 1mM espermina / 2mM espermidina inmediatamente después de su purificación, durante distintos tiempos (5, 10, 15 y 20 min) y a una misma temperatura de 35° C. La muestra control estaba libre de policationes y se incubó durante 20 min. Tras la incubación se lavaron los núcleos con el mismo medio sin espermina ni espermidina, ya que la digestión con DNasa I en su presencia produce destrucción nuclear, y se continuó la extracción de MNs a 4° C. Después de extraer con 2M NaCl se recogió la fracción S3, que contiene la forma fosforilada de la proteína (Fig 12 a).

Como se esperaba, el análisis densitométrico de las bandas reflejó que tras 20 min de incubación, la proteína fosforilada de 90 KDa se enriquecía en los sobrenadantes S3 hasta un 50% en comparación con la banda control (Fig 12 a, b). Las mismas membranas se tiñeron con rojo Ponceau y se analizó la D.O. de las

variantes de la histona H1 como control de carga antes de la incubación (Fig 12 a), sin detectarse variaciones significativas.



**Figura 12. Efecto de la inhibición y estimulación de la Caseína Kinasa CK2 endógena sobre la asociación de la proteína de 90 KDa a la MN.**

(a) Núcleos recién aislados de células proliferantes de la raíz de cebolla tratados con concentraciones crecientes de heparina: 100, 200 y 300 nM; y 0 nM como control; o con espermina / espermidina durante distintos tiempos: 5, 10, 15 y 20 min, y 20 min sin tratamiento como control; provocando respectivamente la inhibición o estimulación específica de la Caseína Kinasa CK2 endógena. Una vez concluido cada tratamiento se continuó la preparación de MNs, ver Fig. 1. La cantidad de proteína de la banda de 90 KDa, detectada con el suero 288 tras extracción con NaCl en el S3, variaba debido al efecto de los tratamientos sobre la CK2, disminuyendo con concentraciones crecientes de heparina y aumentando con el tiempo de incubación con espermina / espermidina. Los niveles de la histona H1 teñida con rojo Ponceau como control de carga apenas variaban. (b) Representación de las medias y desviaciones estándar de los valores de Densidad Óptica x Área (y) de las bandas respecto a cada tratamiento (x) de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar cada valor con el del control (=100%) y el inmediatamente anterior.

### 1.3.4. Efecto de la inhibición de la CK2 endógena

Contrariamente al efecto sinérgico de los policationes, la heparina es capaz de inhibir específicamente la CK2 (Tujera et al, 2003; Westmark et al, 2002).

Se incubaron fracciones nucleares recién preparadas con concentraciones crecientes de heparina (100, 200, 300 y 400 nM) durante 1 hora a temperatura ambiente, siguiendo a continuación el protocolo de extracción de MNs a 4°C. La única variación fue que durante dicho protocolo se añadió a los distintos medios



las correspondientes concentraciones de heparina de cada ensayo, para impedir que su efecto revirtiera durante el proceso de extracción. Al ensayo control no se le añadió heparina en ningún caso. Una vez extraídas las fracciones F2 de los distintos tratamientos con 2M NaCl, se recogieron los correspondientes sobrenadantes S3 que se analizaron mediante inmunoblot con el suero 288 (Fig 12 a).

Contrariamente al caso de los policationes, concentraciones superiores a 300 nM de heparina inhibieron la actividad de la CK2 endógena y provocaron una reducción en la cantidad de proteína de 90 KDa recogida en el sobrenadante S3, de hasta un 30% en comparación con el control (Fig 12 b).

### **1.3.5. Estudio de la proteína de 90 KDa en geles bidimensionales**

Una vez demostrado que la proteína de 90 KDa era fosforilable por la CK2 y que su forma defosforilada permanecía asociada a la MN, mientras que la fosforilada se extraía con alta fuerza iónica; se investigó la existencia de distintos estados de fosforilación calculando su pI en las fracciones S3 y MN, ya que dichos estados varían mínimamente el valor de punto isoeléctrico (pI) de una proteína sin que se produzca en muchos casos un retardo visible de la Mr, pudiendo visualizarse en geles bidimensionales alineados horizontalmente (Droillard *et al*, 1997; Cupo 1991).

El análisis de la fracción S3, con una concentración de sales mayor a 2M, no se pudo realizar. Pese a precipitar sus proteínas con 10% TCA y dializar y/o lavar exhaustivamente en medio acuoso con inhibidores de proteasas, no se pudo reducir la concentración de sales hasta un valor de 0,01M que permitiría realizar el isoelectroenfoque (IEF). Por este motivo, la forma fosforilada de la proteína de 90 KDa no pudo ser analizada directamente en esta fracción.

Otra alternativa para estudiar los dos estados de fosforilación de la proteína era la comparación de geles bidimensionales de la fracción nuclear, que incluye teóricamente los dos estados, con los de la fracción MN que incluye solamente la

proteína defosforilada. En este caso surgió el problema de la baja solubilidad de la proteína de 90 KDa, que resiste la extracción con baja y alta fuerza iónica durante la extracción de MNs.

- **Solubilización de la proteína de 90 KDa**

Para su inmunodetección en filtros monodimensionales se utilizó un medio de solubilización de muestras que contenía 4-8% de SDS, así como sonicación a 22,5 KHz durante 5 segundos a 4° C seguido de 5 minutos de calentamiento a 95° C. Esto nos permitió solubilizar una cantidad de proteína suficiente para su estudio. Sin embargo, los medios de solubilización utilizados en 2-DE no deben contener detergentes iónicos como SDS, ya que su carga influiría en la migración de la proteína a lo largo del gradiente de pH, y tampoco deben ser calentados, ya que contienen urea que con el calor puede modificar el pI de las proteínas.

Se probaron distintos medios de solubilización específicos para 2-DE basados en distintas combinaciones de urea, 2-mercaptoetanol, DTT, Tris-HCl y detergentes no iónicos como CHAPs y Triton X-100 (Tabla 1), que solubilizaron eficazmente un gran número de proteínas nucleares, entre las que no se detectaba la proteína de 90 KDa con el suero 288.

Por ello se desarrolló un método de *doble solubilización*. En primer lugar se solubilizaron las muestras en un volumen mínimo de 20-30µl de medio con 2-mercaptoetanol, Tris-HCl y hasta un 2% SDS, seguido de sonicación a 22,5 KHz durante 5 segundos a 4°C y calentamiento a 95°C durante 5 minutos (Tabla 1). A continuación, se añadió medio sin SDS pero con una cantidad suficiente de Triton X-100 para conseguir una proporción final de SDS:TX-100 de al menos 1:8, y una concentración de SDS menor del 0,25%, lo que garantiza el desplazamiento del detergente iónico por el no iónico en contacto con las proteínas. De esta forma se consiguió solubilizar la proteína de 90 KDa de las fracciones nucleares y de MN, y se abordó su estudio mediante 2-DE.

	Medios de solubilización	Núcleo		MN (NaCl)	MN (LIS)	S1	S3	
		288	91	288	288	288	288	91
2-DE	<b>Medio 2-DE (1)</b> 8M urea; 2% Triton X-100; 2% Mercaptoetanol; 2% Pharmalitos pH 3-10	(-)	<b>78 KDa</b> <b>pI ~5,5</b>	(-)	(-)	<b>78<sup>int</sup> KDa</b> <b>pI ~7,5</b>	*	
	<b>Medio 2-DE (2)</b> 8M urea; 4% CHAPS; 40mM Tris-HCl pH 9,6; 0,5% Pharmalitos pH 3-10	(-)		(-)	(-)		*	
	<b>Medio 2-DE (3)</b> 9,8M urea; 100 mM DTT; 2-5% T X-100; 2% Pharmalitos pH 3-10	(-)		(-)	(-)		*	
	<b>Doble solubilización</b> <sup>1</sup> Medio de dilución 1-DE (<2% SDS)+ <b>95°C +sonicación</b> ; <sup>2</sup> Dilución en Medio 2-DE (3)	<b>90 KDa</b> <b>pI ~8,5</b>		<b>90 KDa</b> <b>pI ~9,5</b>	(-)	<b>78<sup>int</sup> KDa</b> <b>pI ~7,5</b>	*	
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Medio de dilución 1-DE</b> 4% SDS; 10% Mercaptoetanol 0,125 M Tris-HCl pH 6,8	90, 78, 78 <sup>int</sup> KDa	<b>78 KDa</b>	90 KDa	90 KDa	78 <sup>int</sup> KDa	78 KDa	<b>78 KDa</b>

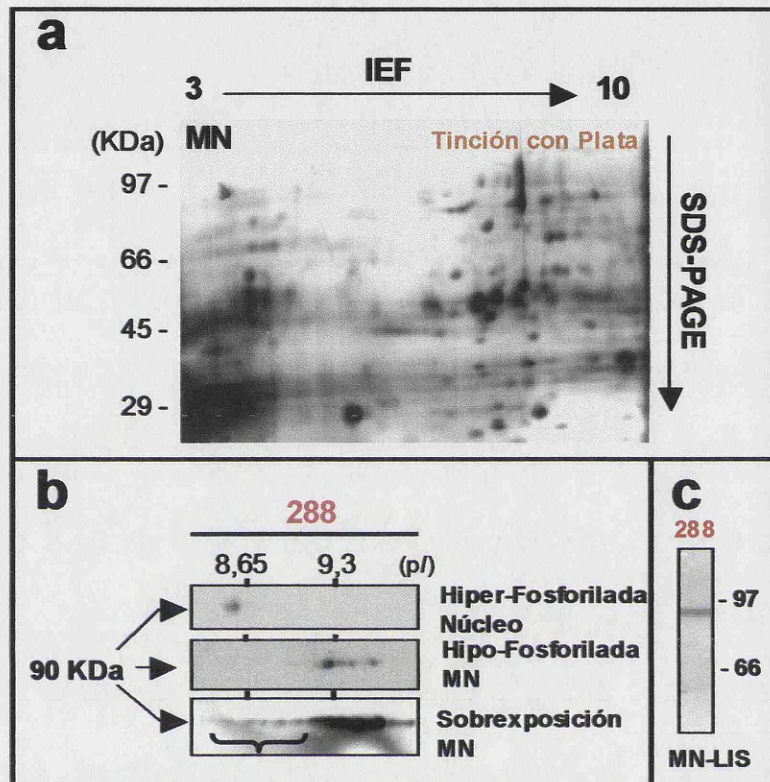
**Tabla 1. Medios de solubilización específicos para SDS-PAGE y electroforesis bidimensional utilizados durante la inmunodetección en membrana de AcMFP1.**

En la tabla se muestra la composición de los tres medios específicos para electroforesis bidimensional (2-DE) utilizados para la solubilización de las proteínas AcMFP1 en distintas muestras subcelulares: núcleos aislados, matrices nucleares (MNs) extraídas mediante alta fuerza iónica (NaCl) y el método de LIS, y en los sobrenadantes S1 y S3. También se muestra el método de doble solubilización, el único que permite disolver la proteína de 90 KDa en medios 2-DE. En la última fila se muestra la composición del medio de dilución utilizado en electroforesis monodimensional (SDS-PAGE), que permite la solubilización de todas las proteínas AcMFP1. (-) Los medios de solubilización 1, 2 y 3 específicos para 2-DE no permiten la solubilización de la proteína de 90 KDa. (\*) La alta concentración de sales del sobrenadante S3 impide su estudio en geles bidimensionales.

#### • Estudio de las fracciones nuclear y de MN en geles bidimensionales

Utilizando el método descrito se solubilizaron cerca de un centenar de proteínas de la fracción de matrices nucleares, que fueron detectadas con tinción de plata. La mayor parte se distribuía por la parte básica de un gel con gradiente de pH de 3,0 a 10,0 (Fig 13 a). En las MNs, el suero 288 detectó cuatro manchas alineadas horizontalmente de 90 KDa con valores de pI en el rango 9,3-9,7, demostrando la existencia de varios estados hipo-fosforilados en la fracción insoluble de la proteína (Fig 13 b). Al sobrexponer la película se detectaron además de las cuatro señales más intensas (9,3-9,7), una fila de manchas más pequeñas y de baja intensidad entre 8,5-9,3 correspondientes

probablemente a trazas de los estados hiper-fosforilados, que no fueron completamente extraídos mediante 2M NaCl (Fig 13 b).



**Figura 13. Separación y detección de la proteína de 90 KDa en fracciones de núcleos y matrices nucleares mediante electroforesis bidimensional.**

**(a)** Proteínas de MN preparadas mediante *doble solubilización* y separadas mediante electroforesis bidimensional. Tinción con plata. **(b)** Inmunodetección en membrana con el suero 288 de proteínas de núcleos y matrices nucleares separadas mediante electroforesis bidimensional. Se observan los estados hiperfosforilados de la proteína de 90 KDa en la fracción nuclear (pI ~8,5) , y los estados hipofosforilados en la fracción de MNs (pI ~9,5). **(c)** Inmunodetección de la proteína de 90 KDa con el suero 288 en MNs preparadas por el método de LIS.

Sorprendentemente, la incubación de fracciones nucleares separadas mediante 2-DE con el suero 288 sólo mostraba dos manchas de 90 KDa y pI ~8,5 (Fig 13 b), cuando en esta fracción esperábamos detectar todos los estados de fosforilación de la proteína. Esto podría deberse a que el lavado de una estructura celular con NaCl previo a su solubilización en medios 2-DE, enriquece la muestra en determinadas proteínas y la empobrece en otras, como demostraron Friso y Wikström (1999). Por esta razón detectamos las formas hipo-

fosforiladas en las MNs lavadas previamente con 2M NaCl, pero no en los núcleos que no se lavaron con NaCl.

- **Estudio de la fracción MN-LIS**

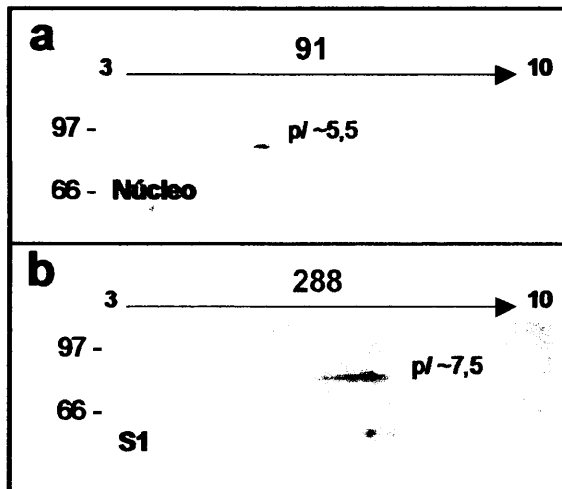
La utilización de alta fuerza iónica (2M NaCl) durante la preparación de MNs puede provocar un reordenamiento general de sus componentes, incluyendo la precipitación de complejos como los de transcripción y replicación (Jackson y Cook, 1995). Por ello se prepararon MNs mediante un procedimiento de extracción de baja fuerza iónica, con detergente LIS y digestión con DNasa I desarrollado en el laboratorio (Mínguez, 1995; Moreno Díaz de la Espina, 1995) basado en el de Mirkovitch y colaboradores (1984), y sin utilizar en ningún caso extracción con alta fuerza iónica ni estabilización por calor. Aunque ultraestructuralmente la MN-LIS y la MN obtenida mediante alta fuerza iónica son similares, su composición polipeptídica en geles bidimensionales es distinta (Mínguez, 1995; Moreno Díaz de la Espina, 1995).

Se comprobó mediante inmunodetección en membranas monodimensionales que el suero 288 detectaba la banda de 90 KDa, pero no la de 78 KDa, en las MN-LIS tras solubilizar con 4% SDS, sonicación y calentamiento a 95° C (Fig 13 c), confirmando que, independientemente del método usado para la preparación de matrices nucleares, la proteína de 90 KDa es un componente de las mismas (MN y MN-LIS), pero no así la de 78 KDa (Figs 6, 7 y 13 c).

Cuando se solubilizó la fracción MN-LIS en medios específicos para 2-DE o mediante el método de *doble solubilización* descrito anteriormente (Tabla 1), el suero 288 no detectaba ninguna banda en estas fracciones, coincidiendo con el resultado obtenido para los núcleos en el sentido de que los estados hipofosforilados de la proteína unidos fuertemente a la MN, necesitan ser tratados con NaCl para su solubilización en medios específicos para electroforesis bidimensional, que contienen menos de un 2% de SDS.

### 1.3.6. Estudio de las proteínas de 78 KDa en geles bidimensionales

Se calcularon los valores de  $pI$  de la banda superior de 78 KDa, detectada en núcleos aislados por los sueros 288 y 91 (Figs 6 y 7), y de la banda inferior de 78 KDa detectada exclusivamente por el suero 288 (Fig 6). Para el cálculo del  $pI$  de las bandas de 78 KDa se utilizaron núcleos aislados y el sobrenadante S1 procedente del lavado con TX-100 de los núcleos. En estos casos la solubilización de las proteínas no fue complicada, obteniéndose resultados positivos tanto con los medios específicos para 2-DE (Tabla 1) como con el método de *doble solubilización*. La obtención de idénticos resultados en ambos casos confirma la validez del segundo método, en el que se utiliza una pequeña concentración final de SDS menor del 0,25%.



**Figura 14. Inmunodetección de las proteínas de 78 KDa con los sueros 91 y 288 en las fracciones nuclear y S1 separadas mediante electroforesis bidimensional.**

**(a)** Proteínas de núcleos aislados incubadas con el suero 91. Las dos manchas detectadas tienen un valor de  $pI$   $\sim 5,5$ . **(b)** Proteínas del sobrenadante S1 incubadas con el suero 288. Las manchas detectadas poseen un  $pI$   $\sim 7,5$  y corresponden por su  $M_r$  a la banda inferior de 78 KDa, ver Fig 6. También se detectan varias manchas de  $\sim 55$  KDa.

Las fracciones nucleares se solubilizaron en medio de disociación para IEF que contenía urea, 2-mercaptoetanol y Triton X-100, y se separaron bidimensionalmente. Las membranas transferidas de estos geles se incubaron con el suero 91, que detectó dos manchas de 78 KDa con un  $pI$  de  $\sim 5,5$  (Fig 14

a), valor aproximado al pI de AtMFP1 y LeMFP1 (Jeong et al, 2004; Meier et al, 1996). El medio de disociación para IEF contenía urea, razón por la que no detectamos la forma polimerizada de 160 KDa.

De forma similar, se solubilizaron en el mismo medio las proteínas del sobrenadante S1, precipitado con 10% TCA, que contiene la banda inferior de 78 KDa reconocida por el suero 288. Se obtuvieron varias manchas de 78 KDa con un pI ~7,5 y otras manchas de 55 KDa con el mismo pI (Fig 14 b), que suelen acompañar a la primera en las fracciones citoplasmática y S1.

## **2. CLONACIÓN DE *AcMFP1***

### **2.1. Rastreo de una genoteca de cDNA de cebolla mediante PCR**

Se diseñaron distintos cebadores específicos a partir de las regiones más conservadas de los genes *MFP1* conocidos, localizadas en el dominio cercano al extremo C-terminal de las proteínas. Este dominio es el más específico por contener la región de unión a MARs, evitando así la región central *coiled-coil* más conservada con otras proteínas tipo Filamento Intermedio y la región hidrofóbica N-terminal conservada en proteínas transmembrana.

Se alinearon 800 nucleótidos de las secuencias de tres especies de dicotiledóneas (*AtMFP1*, *LeMFP1*, *NtMFP1-1* y *NtMFP1-2*) con cuatro secuencias parciales conocidas de monocotiledóneas obtenidas del NCBI (*Hordeum*, maíz, arroz y trigo). Se seleccionaron las tres regiones más conservadas tanto en secuencia de nucleótidos (Fig 15) como de aminoácidos (Fig 16). No todos los nucleótidos coincidían en la alineación de las secuencias, principalmente diferían las secuencias de *Arabidopsis* y maíz. En estos casos se optó por el nucleótido mayoritario en el resto de las especies. Así, se diseñó un cebador que permitía una amplificación en sentido 5'-3' (denominado MFP1-5') y dos complementarios en sentido 3'-5' (MFP1-3' a y b) (Figs 15 y 16).

HvMFP1	CGGT AGA GAG AAC CAG CCG AAA AA GCG ACG CCG GAAGCA	<u>CGAAGAGAA</u> -TCTCT
ZmMFP1	AACTT CA-AGT T-AGT GAAAC ACG GAGG-CAATCT	<u>CGACGAGAGAAAGGCTCT</u>
OsMFP1	-----C AAGAGGA ACG CAAAG A-	<u>CGAGAGAA</u> -TCTAT
TsMFP1	CGGT AGA GAG AAC CAG CCG AAA AA GCG ACG CCG GAAGCA	<u>CGAAGAGAA</u> -TCTCT
<b>AtMFP1</b>	AGAAAAAGAGCT-----GCGCT-----GAA-----AAAG-A	<u>GCT GAAAGGAT GAA</u>
<b>LtMFP1</b>	AACT GAGAGCTTCT AATCTCG GCG AA C AAGCG GAAG-AC	<u>CGAGAGAGG</u> -TCAAC
<b>HvMFP1-1</b>	ACCT GAGAGT GAG AA C A A A A A A GAGG-A	<u>CGAGAGAGG</u> -TCTCC
<b>HvMFP1-2</b>	AACT GAGAGT GAG AA CCG A A A A A A A AAG-A	<u>CGAGAGAGG</u> -TCTCC

GCGAAGGAAA-TGCTATCAA  
 GAGGCAGGAAAAATCTCGA  
 GCGAAGGAAA-TGCTATCAA  
 GCGAAGGAAA-TGCTATCAA  
 GGTGAGAGGANTGGAAAGCA  
 GAGCGAAG-TGCAACGCA  
 GCGAGGAG-TGCTCCAAA  
 GCGAGGAG-TGCTCCAAA

HvMF1	ATGGCTCAAAATCTTA-TCACGAGAGCTTCAACAAAGAAAGAGAGCTTCAAGAA-TGAGAGC
ZmMF1	TTACCTGCTTAAAGAACTTGAAGAGACTCTATCTAGGAGAGCCGCACTTCAAACTTGAAGAG
OsMF1	ATGCTCAAGAACTTCA-CTCTAGGCTGACAGCAAGAGAGAGTCTCAAAA-TGAGAGC
TsMF1	ATGCTCAAGAACTTAA-CAAGAGAGCTTCAAGCAAGAGAGAGAGTCTGAAAT-TGAGAGC
<b>LtMF1</b>	AAAGCTTAAAGCTCTAGATGAGATGAACAAG-AACATCAAACTCTCTAC-TAGAGC
<b>LtMF1-1</b>	AGGCCCA-TAGCTTGGATGAAAGCTTCAAGAGAGAGCAGAA-TCTTGAAGAA-GAGAGC
<b>LtMF1-1-1</b>	ATGCCCA-TAGCTTGGAGAGAAAGAACTTGGCAAGAGAGAGAGAGAGTGGAGAA-GAGAGC
<b>LtMF1-1-2</b>	ATGCCCA-TAGCTTGGAGAGAACTTGGCAAGAGAGAGAGAGAGTGGAGAA-GAGAGC

HvMEP1	TAGGACACCG	GAAAGAGGAACTGGCGTT-ACCG	AAG	GGTGAGATGTTCCG	-GCAAG-A
ZmMEP1	-AAATGTTAT	GCA-AGGCTCTACG-TG-ACCA	ACC	GAATTCACACCCG	AAATGAG-A
OsMEP1	TSACATGAT	GAAAGAGGAGTGGCGTT-ACCA	ACG	GGTGAGATTTCCG	-GCAAG-A
TsMEP1	TTGACACCG	GAAAGAGGAACTGGCGTT-ACCG	ACG	GGTGAGATTTCCG	-GCAAG-A
<i>AtMEP1</i>	TT-GA----	GAAAGTGA-TACCCATGCTTC	AAC	-----TTGGG	-G-AG-A
<i>MeMEP1</i>	AAAAGAAATG	GAAATGAATGCG-A-GCAC	AAA	GGTGAGATTTTCCG	-GCAAG-A
<i>FCMEP1-1</i>	AAAAGAAATG	GAAATGAATGCG-AT-CACG	AAA	GGTGAGATTTTCCG	-GCAAG-A
<i>FCMEP1-2</i>	AAAAGAAATG	GAAATGAATGCG-AT-CACG	AAA	GGTGAGATTTTCCG	-GCAAG-A

80



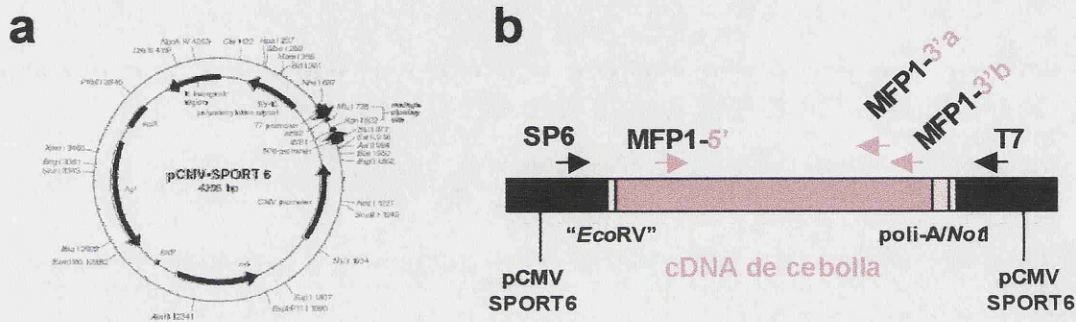


HvMFP1	-----	-----	-----	-----	-----
OsMFP1	-----	-----	-----	-----	-----
<b>AtMFP1</b>	...NEISASELAL	EKDLRRRVKD	ELEGVTHELK	ESSVKNQSLQ	KELVEIYKKV
<b>LeMFP1</b>	-----	-----	-----	-----	-----
<b>NtMFP1-1</b>	-----	-----	-----	--TENCNLIQ	TELVDVYKKA
<b>NtMFP1-2</b>	-----	-----	-----	-----	-----KKA
HvMFP1	-----ELVEE	RKIVTALNKE	LEALAKQLQV	DSEARKSLES	DLEEATKSLD
OsMFP1	-----	-----	-----	-----	-----
<b>AtMFP1</b>	ETSNKELEEE	KKTVLSLNKE	VKGMEKQILM	EREARKSLET	DLEEAVKSLD
<b>LeMFP1</b>	-HTRNELKQE	KTIVRTLEEE	LKFLESQITR	EKELRKSLED	ELEKATESLD
<b>NtMFP1-1</b>	ERADELKQE	KNI VVTLEKE	LTFLEAQITR	EKESRKNLEE	ELERATESLD
<b>NtMFP1-2</b>	ERAVNELKQE	KNI VVTLEKE	LTFLEAQITR	EKESRKNLEE	ELERATESLD
HvMFP1	EMNNSALLLS	KELESTHSRS	AT <b>LESEKEMI</b>	RKALAEQTKI	TTEAKENTED
OsMFP1	-----	---RETSSRK	DT <b>LEAEKRM</b>	SKALAEQOKI	TTEAHENTED
<b>AtMFP1</b>	EMNKNTSILS	RELEKVNTHA	SN <b>LEDEKEVL</b>	QKSLGEAKNA	SKEAKENVED
<b>LeMFP1</b>	EINRNVLALA	EELELATSRN	SS <b>LEDEREVH</b>	RQSVSEKQKI	SQEAQENLED
<b>NtMFP1-1</b>	EMNRNAFALA	KELELANSHI	SS <b>LEDEREVL</b>	QKSVSEKQKI	SQESRENLED
<b>NtMFP1-2</b>	EMNRNAFALA	KELELANSHI	SS <b>LEDEREVL</b>	QKSVSEKQKI	SQEAQENLED
MFP1-5'					
HvMFP1	AQNLI TRLET	EKESFELRCR	H <b>LEELAL AK GEIL</b>	RLRRQI	STNSSQKPRA
OsMFP1	AQNLI SRLQT	EKESFEMRAR	H <b>LEELAL AK GEIL</b>	RLRRQI	STSRSQK---
<b>AtMFP1</b>	AHILVMSLGK	EREVLEKKVK	K <b>LEEDLGS AK GEIL</b>	RMRSQP	DSVKAVNS--
<b>LeMFP1</b>	AHSLVMKLGK	ERESLEKRAK	K <b>LEDEMAA AK GEIL</b>	RLRSQI	NSVKAPVE--
<b>NtMFP1-1</b>	AHSLVMKLGK	ERESLEKRAK	K <b>LEDEMAS AK GEIL</b>	RLRTQV	NSVKAPVN--
<b>NtMFP1-2</b>	AHSLVMKLGK	ERESLEKRAK	K <b>LEDEMAS AK GEIL</b>	RLRTQV	NSVKAPVN--
MFP1-3' a					
HvMFP1	RGPEASETL	KEQPVNDYNQ	KTSGVVAGTP	QPVKRTVRRR	KGGA-
OsMFP1	-----AKTL	P-----NT	NASPEVSQAP	X--RAGCE--	-----
<b>AtMFP1</b>	-----TDNKE	KS-----	DNTVTVKKV	RRRKSSTSS-	-----
<b>LeMFP1</b>	-----DEEKV	VAG-----E	KEKVNQQ--	-----	-----
<b>NtMFP1-1</b>	-----NEEKV	EAG-----E	KAATVTKRTR	RRKTATQPAS	QOESS
<b>NtMFP1-2</b>	-----KEEKV	EAG-----E	KATVTKRTR	RRKTATPAS	QOEGS

Figura 16. Alineación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas MFP1 de distintas especies.

Alineación de las secuencias de aminoácidos de MFP1 de tomate (Le), las dos proteínas de tabaco (Nt), *Arabidopsis* (At), arroz (So) y *Hordeum* (Hv). Aparecen recuadradas las secuencias traducidas de los cebadores MFP1-5' y MFP1-3' a y b, véase Fig. 15.

El cDNA de cebolla venía integrado en el vector pCMV-SPORT 6 (Fig 17 a). Se amplificó la genoteca a 50°C de temperatura de anillamiento, utilizando distintas combinaciones de cebadores: bien ambos específicos simultáneamente o bien uno específico con uno no específico de zonas cercanas del vector (Fig17b).



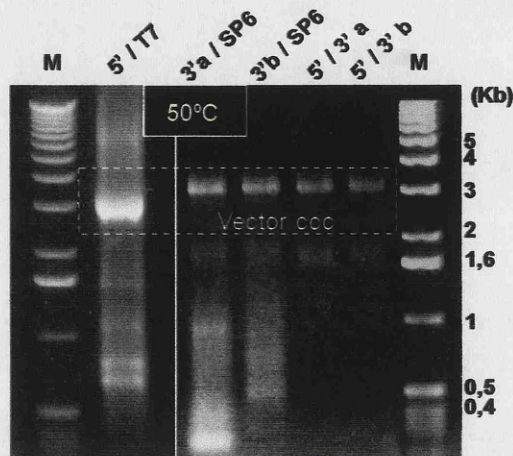
**Figura 17. Mapa de la inserción del cDNA de cebolla en el vector de la genoteca.**

**(a)** Mapa del vector pCMV-SPORT6 de la genoteca. **(b)** Mapa de inserción de los fragmentos de cDNA de cebolla en el vector. La cola poliA-NoI del fragmento de cDNA se ligó al sitio de restricción NoI del plásmido. El extremo romo 5' del cDNA está ligado al sitio romo de restricción EcoRV. Se muestran los cebadores utilizados durante el rastreo por PCR, tanto los diseñados específicamente (rosa) como los utilizados pertenecientes al vector (negro).

Las reacciones con ambos cebadores específicos no produjeron amplificación, mientras que las reacciones de cebadores específicos combinados con cebadores externos inespecíficos, produjeron largas manchas sobre las que se distinguían algunas bandas más prominentes (Fig 18).

A partir de este momento se siguieron dos estrategias distintas. En una primera estrategia se clonaron los productos de cada reacción en un nuevo vector pCRII-TOPO, transformando bacterias competentes de *E. coli* TOP10. Se realizó un rastreo de 200 colonias transformadas seleccionando los insertos de cDNA de mayor tamaño (Fig 19). Las secuencias de estos insertos de cDNA incluían una región correspondiente a los vectores pCRII-TOPO ó pCMV-SPORT6, seguida de una cola poli-dT o cebador específico, y finalmente una secuencia de unas 700 bases de cDNA de cebolla.



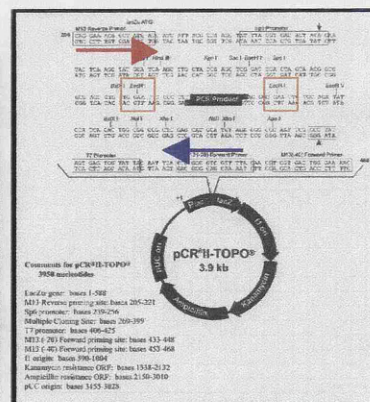
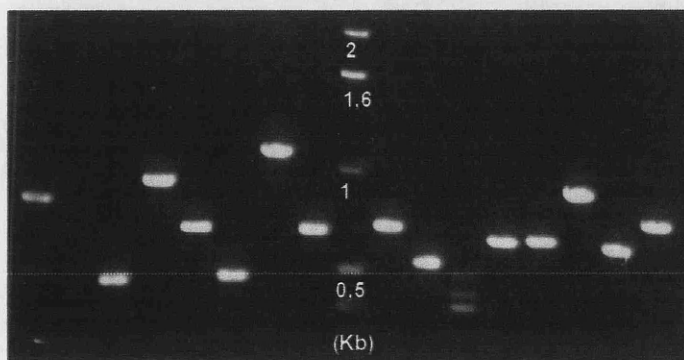


**Figura 18. Productos de PCR obtenidos con distintas combinaciones de cebadores MFP1.**

Productos de amplificación por PCR separados en gel de agarosa, se observan manchas entre 0,3-1,6 Kb, entre las que destacan ligeramente algunas bandas. Las reacciones se hicieron a una temperatura de anillamiento de 50° C, utilizando combinaciones de cebadores específicos-MFP1 con cebadores externos situados en el vector (SP6 ó T7).

Ninguna de las secuencias obtenidas se pudo alinear con las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de MFP1. La búsqueda en las bases de datos del NCBI demostró similitud parcial de las secuencias obtenidas con diversos genes vegetales, ninguno de ellos *MFP1*.

**Insertos de cDNA seleccionados del producto MFP1-3'a / SP6**

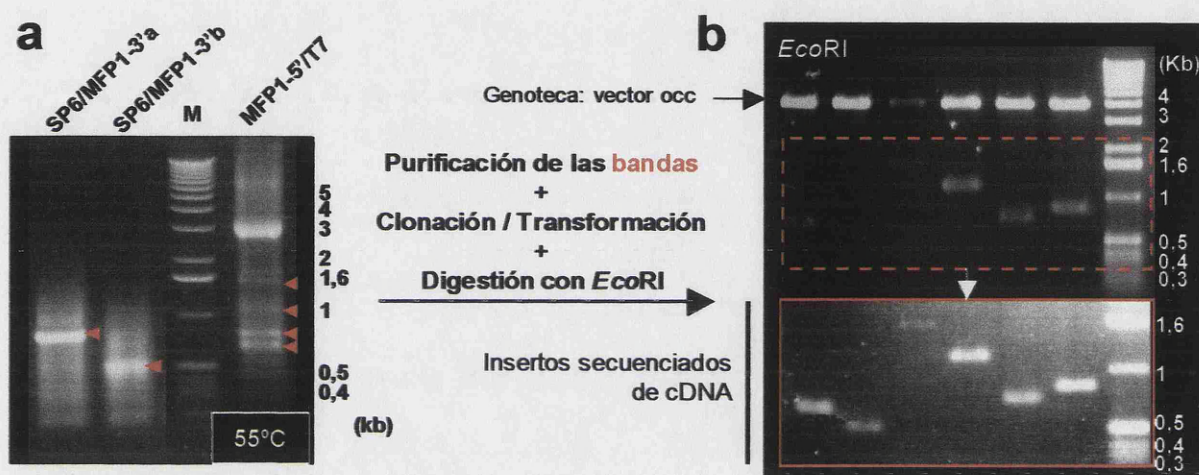


**Figura 19. Rastreo de colonias transformadas con el producto de amplificación MFP1-3'a / SP6.**

Se rastrearon 200 colonias transformadas con el producto de amplificación de MFP1-3' a / SP6. Se muestran las bandas correspondientes a los insertos seleccionados (mayores de 0,5 Kb) de cDNA de cebolla. La clonación se realizó sobre el vector pCRII-TOPO (derecha), gracias a la adenina libre del extremo 3' generada por la Transcriptasa Inversa.



En una segunda estrategia se purificaron las bandas de ADN más intensas de las distintas reacciones de amplificación por PCR a 55° C de temperatura de anillamiento. En concreto, dos bandas amplificadas por los cebadores SP6/MFP1-3'a y b; y cuatro bandas de la reacción MFP1-5'/T7 (Figs 17 b y 20 a).



**Figura 20. Purificación y clonación de las bandas amplificadas mediante distintas combinaciones de cebadores MFP1.**

**(a)** Productos de PCR obtenidos durante la amplificación de una genoteca de cebolla mediante las siguientes combinaciones de cebadores: SP6 / MFP1-3' a; SP6 / MFP1-3' b y MFP1-5' / T7, a 55°C de temperatura de anillamiento. Se purificaron y se clonaron en el vector pCRII-TOPO las bandas más patentes (flechas rojas). **(b)** Productos de digestión con EcoRI de los plásmidos de las colonias transformadas con las bandas purificadas en (a). Se muestra el mismo gel de agarosa sobrepuesto para resaltar algunas de las bandas.

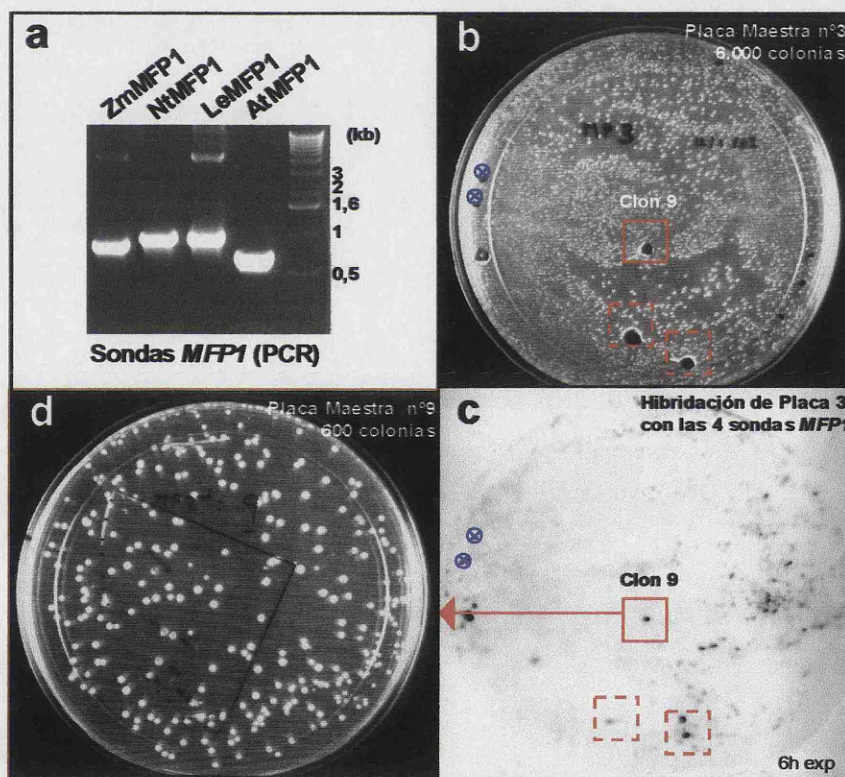
## 2.2. Rastreo de una genoteca de cDNA de cebolla mediante hibridación de colonias

El rastreo de una genoteca mediante hibridación directa de sondas específicas sobre colonias bacterianas implica un cálculo previo. Asumiendo que MFP1 no sea un gen raro, se estimó que su concentración en una genoteca normalizada sería >0,1%. Así, analizando 50.000 colonias se tendría un 99% de probabilidades de detectar *AcMFP1*, asumiendo que las sondas se unan con suficiente afinidad al fragmento de cDNA.



Se utilizaron cuatro sondas consistentes en fragmentos de 0,8-1,0 Kb correspondientes a la zona C-terminal de *MFP1* de *Arabidopsis*, tomate, tabaco y maíz. Las sondas fueron preparadas mediante PCR en presencia de una proporción mínima de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP (Fig 21 a).

Se analizaron en una primera ronda 11 placas con unas 6.000 colonias/placa (Fig 21 b). Para ello, se hibridó el ADN bacteriano desnaturalizado y unido a filtros-réplica de nylon, con las 4 sondas desnaturalizadas simultáneamente a 50°C (Fig 21 c). Las colonias con mayor señal se aislaron en nuevas placas (Fig 21 d), extendiendo esta vez unas 600 colonias/placa y volviendo a hibridar a 55°C en una segunda ronda.

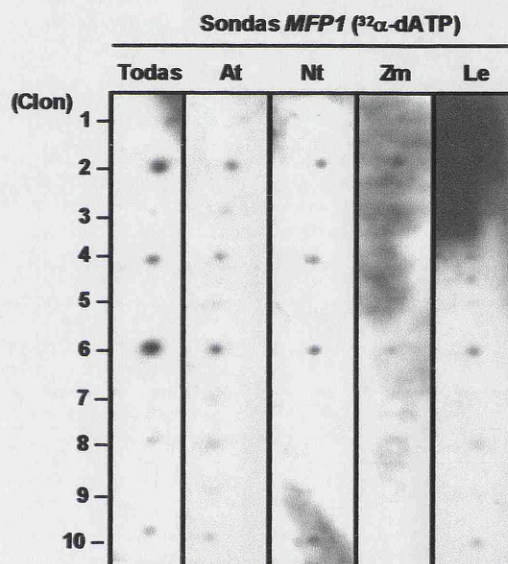


**Figura 21. Rastreo de una genoteca de cDNA de cebolla mediante hibridación de colonias con sondas *MFP1*: primera y segunda rondas de hibridación.**

(a) Las cuatro sondas *MFP1* de tabaco, tomate, *Arabidopsis* y maíz utilizadas durante el rastreo de la genoteca separadas en un gel de agarosa. (b) Imagen de la placa maestra n°3, contiene una extensión de unas 6.000 colonias de la genoteca. En azul se indican las marcas de posición relativa entre la placa maestra y el filtro réplica de nylon sobre el que se realiza la hibridación. (c) Imagen de una película expuesta sobre el filtro réplica de la placa maestra n°3 hibridada con las cuatro sondas simultáneamente. En rojo se muestran los clones seleccionados para una segunda ronda de hibridación. (d) Placa maestra con una extensión de ~600 colonias del clon n° 9 seleccionado durante la primera ronda.



Las colonias que de nuevo presentaron señal intensa se hibridaron esta vez con cada una de las sondas por separado en una tercera ronda (Fig 22), secuenciando sus insertos de cDNA. Ninguna de las secuencias estudiadas resultó ser *AcMFP1*, aunque compartían cierta similitud con fragmentos de variadas proteínas vegetales. El análisis de la predicción de estructuras secundarias de las secuencias traducidas clonadas no incluía dominios *coiled-coil*.



**Figura 22. Rastreo de una genoteca de cDNA de cebolla mediante hibridación de colonias con sondas *MFP1*: tercera ronda de hibridación.**

Hibridaciones en gota de las colonias seleccionadas tras la segunda ronda de hibridación (ver Fig. anterior) con las cuatro sondas simultáneamente y con cada una de ellas por separado.

### 3. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN TOPOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS DE 78 y 90 KDa EN DISTINTOS TEJIDOS Y SITUACIÓN FISIOLÓGICAS

#### 3.1. Núcleos de células proliferantes asincrónicas y sincronizadas durante el ciclo celular

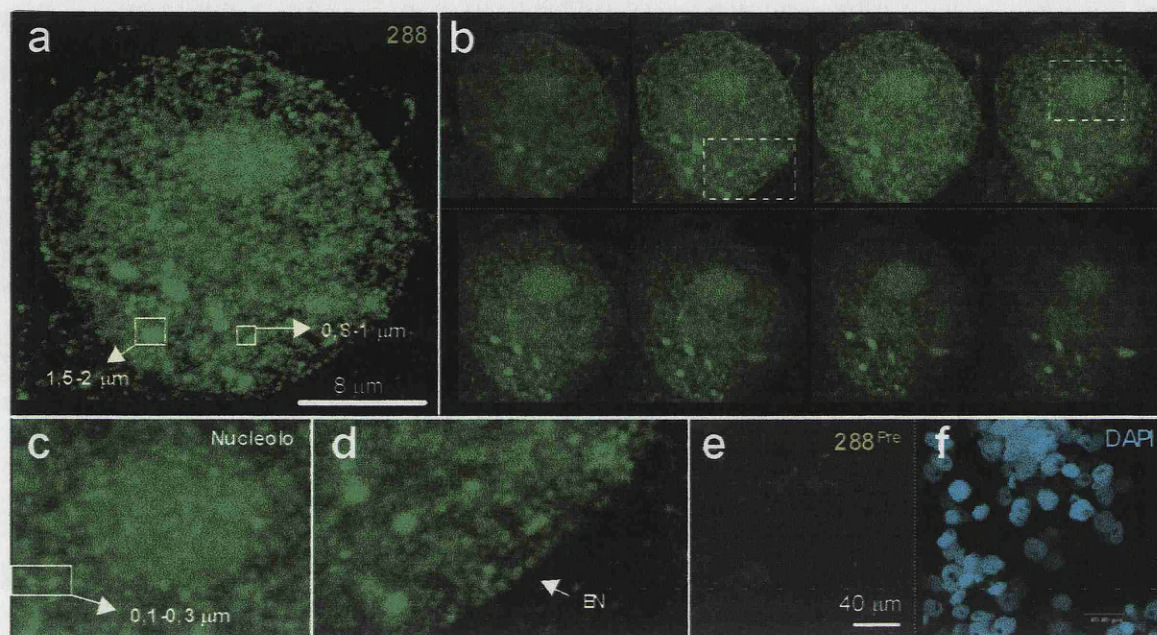
##### 3.1.1. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

La distribución topológica de las proteínas detectadas por los sueros anti-LeMFP1 (288) y anti-AtMFP1 (91) se estudió mediante inmunofluorescencia (IF) en aplastados celulares y fracciones nucleares de células proliferantes del meristemo radicular de cebolla. Ambos sueros presentaron dificultades para penetrar en el núcleo siguiendo los protocolos convencionales de IF para este material, como se comprobó en incubaciones simultáneas con otros sueros monoclonales que accedían sin problema al interior del mismo. Por este motivo, las incubaciones se realizaron mayoritariamente en núcleos aislados, en movimiento constante y durante los mismos períodos de tiempo, lo que incrementó considerablemente la efectividad de los marcados.

- **Núcleos proliferantes no sincronizados**

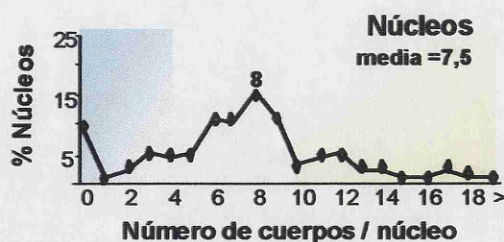
La máxima intensidad del marcado nuclear con el **suero 288** se detectó en subdominios nucleares o cuerpos de número y tamaño variable, con una localización en muchos casos polarizada dentro del núcleo (Fig 23 a, b). Los cuerpos se clasificaron según su tamaño, de menor ( $\varnothing$ : 0,8-1  $\mu$ m) o mayor diámetro ( $\varnothing$ : 1,5-2  $\mu$ m). No se pudo establecer ningún tipo de relación entre el número de cuerpos y las características estructurales del núcleo observadas al microscopio óptico.





**Figura 23. Distribución de las proteínas AcMFP1 detectadas con el suero 288 en núcleos aislados de células proliferantes de raíz de cebolla.**

(a) Imagen correspondiente a la proyección de diez cortes virtuales tomados mediante Microscopía Confocal de fluorescencia. El inmunomarcado con el suero 288 se acumula en cuerpos nucleares de tamaño variable (recuadros amarillos); en numerosos focos fluorescentes distribuidos por el núcleo que adoptan un patrón *punteado*; y en el nucleolo. (b) Sucesión de cortes virtuales tomados cada micra a lo largo del eje z del núcleo anterior, mostrando la distribución de estas estructuras a distintos niveles del núcleo. (c y d) Detalles del núcleo anterior mostrando la distribución del marcado en el nucleolo (c) y los cuerpos y la alineación de focos en la envoltura nuclear (EN) (d). (e) Incubación de fracciones nucleares con el suero preinmune control (288<sup>Pre</sup>). (f) Tinción con DAPI de la preparación anterior.



**Figura 24. Recuento del número de cuerpos de AcMFP1 en núcleos proliferantes de la raíz de cebolla.**

Representación de las frecuencias de núcleos (eje y) con distintos números de cuerpos de AcMFP1 marcados con el suero 288 (eje x) de poblaciones de núcleos proliferantes de raíz. La moda es 8, y la media de cuerpos por núcleo marcado es 7,5.

Además de los cuerpos, los núcleos proliferantes mostraron un marcado general por el retículo nuclear sobre el que se distinguían numerosos focos fluorescentes circulares de pequeño tamaño ( $\varnothing$ : 100-300nm) dando lugar a un patrón *punteado* de distribución, observable en secciones confocales (Fig 23 a, b, c). Algunos núcleos presentaban marcado nucleolar más intenso (Fig 23 c), y pequeños focos de marcado alineados a lo largo de la envoltura nuclear (Fig 23 d). La incubación de los núcleos con el correspondiente suero preinmune control, a la misma concentración y en las mismas condiciones, no dio señal específica de fluorescencia (Fig 23 e, f).

El análisis cuantitativo de la distribución del marcado de al menos 100 núcleos de células proliferantes del meristemo radicular, reveló que el 91% de los núcleos poseía cuerpos en número variable, que oscilaba entre 1 y 18. Los núcleos con 6-9 cuerpos fueron los más frecuentes, siendo más escasos los núcleos con números de cuerpos comprendidos entre 2-5 y 10-18, y una media de 7,5 cuerpos por núcleo meristemático proliferante marcado (Fig 24).

En los núcleos con menos de diez cuerpos observamos frecuentes combinaciones de cuerpos grandes y pequeños, mientras que en núcleos con más de 10 cuerpos éstos solían ser todos pequeños.

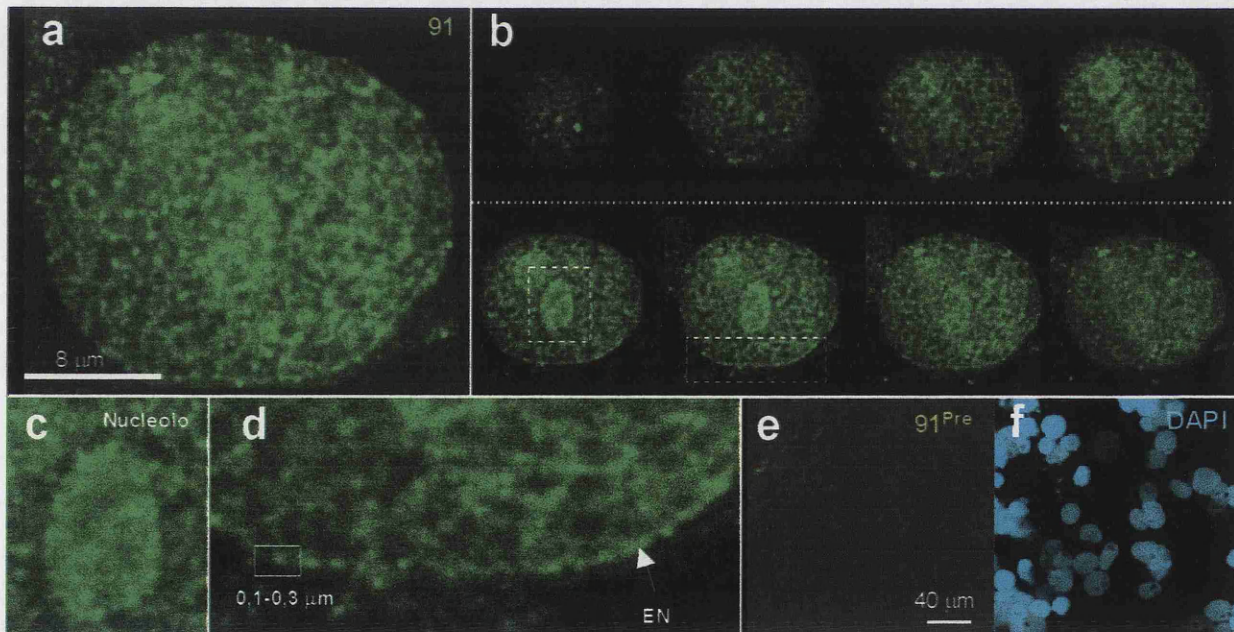
Por otro lado, el 77% de los núcleos presentaba el patrón *punteado* descrito; y un 19% adicional poseía el mismo patrón, incluyendo marcado de mayor intensidad en el nucleolo. Un porcentaje mínimo de núcleos (4%) poseía los focos ordenados o alineados originando un patrón *reticulado* de distribución, con numerosas zonas sin marcado que le hace distinguible del patrón *punteado* y que describiremos más adelante.

El mismo análisis con el **suero 91** mostró un patrón de marcado *punteado* similar al detectado con el suero 288 (Fig 25 a, b, d), incluyendo la alineación de focos en la envoltura nuclear (Fig 25 d). Con este suero se detectó una mayor proporción de núcleos (49%) con señal adicional en el nucleolo (Fig 25 c). La



incubación con el suero 91 preimmune control no mostró señal en estos mismos núcleos incubando en las mismas condiciones (Fig 25 e, f).

La principal diferencia entre las distribuciones topológicas obtenidas con ambos sueros fue la ausencia de cuerpos marcados con el suero 91. Sólo ocasionalmente se detectaron focos de tamaño similar a los detectados con 288 (Fig 25 b), pero que no necesariamente corresponden a los mismos subdominios nucleares. Estos resultados sugieren que los sitios de acumulación de la proteína de 90 KDa serían los cuerpos nucleares detectados exclusivamente con el suero 288, sin excluir su distribución por otras partes del núcleo.



**Figura 25. Distribución de las proteínas AcMFP1 detectadas con el suero 91 en núcleos aislados de células proliferantes de raíz de cebolla.**

**(a)** Imagen correspondiente a la proyección de diez cortes virtuales tomados mediante Microscopía Confocal de fluorescencia. El marcado con el suero 91 se detectó en numerosos pequeños focos fluorescentes distribuidos por el núcleo adoptando un patrón *punteado*; y en el nucleolo. No se observaron cuerpos de AcMFP1. **(b)** Sucesión de cortes virtuales tomados cada micra a lo largo del eje z nuclear. **(c y d)** Detalle de los cortes anteriores mostrando el marcado del nucleolo (c) y la alineación de focos en la envoltura nuclear (EN) (d). **(e)** Incubación de fracciones nucleares con el suero preimmune control (91<sup>Pre</sup>). **(f)** Tinción con DAPI de la preparación anterior.

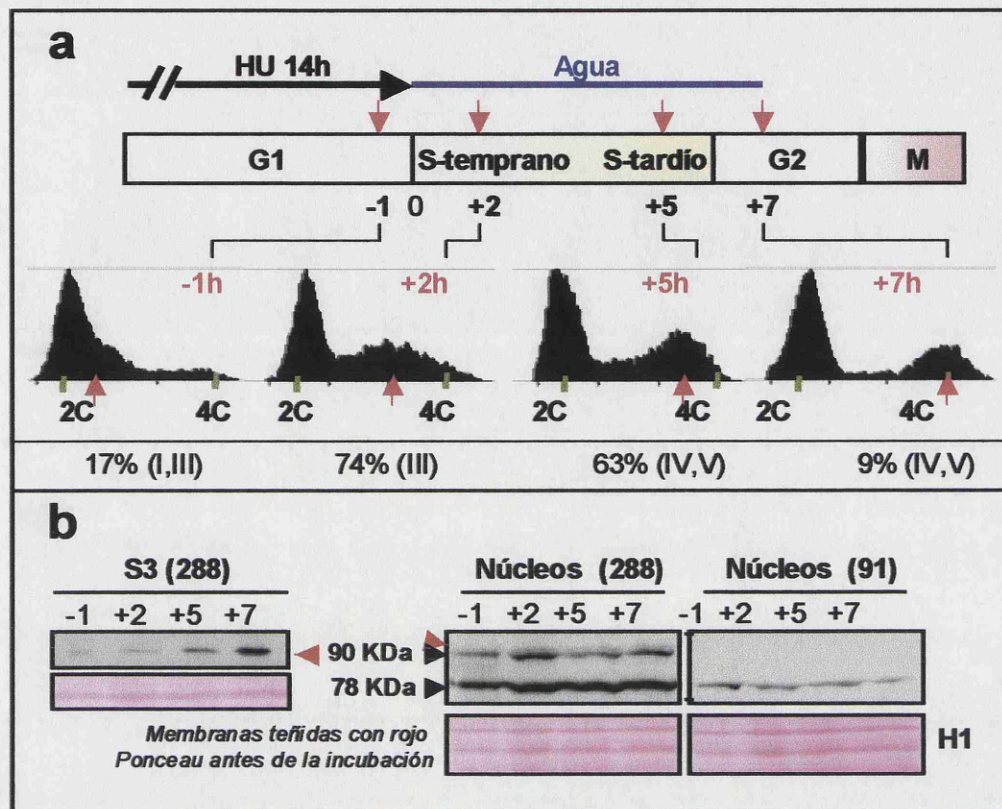
- **Expresión y distribución a lo largo del ciclo celular**

Muchas proteínas nucleares varían sus niveles de expresión y su localización subnuclear a lo largo del ciclo celular. Estas variaciones están relacionadas con su funcionalidad y responden a modificaciones específicas en la proteína.

Para estudiar si las proteínas AcMFP1 experimentaban este tipo de variaciones, analizamos los niveles de las mismas mediante inmunodetección en membrana y sus patrones de distribución nuclear mediante IF en distintos momentos del ciclo celular. Se utilizaron células proliferantes del meristemo radicular sincronizadas mediante 14h de exposición a 0,1M hidroxurea (HU), que las detiene temporalmente en el punto de chequeo del comienzo de la fase S, de tal forma que las células detenidas comienzan a replicar simultáneamente cuando se retira la droga. El porcentaje de células proliferantes del meristemo radicular de cebolla es elevado (70-75%), lo que permite sincronizar la mayor parte de la población meristemática y analizarla en distintos momentos del ciclo celular.

Se estudiaron cuatro puntos concretos del ciclo celular. El G1-tardío/S-temprano, en el que los complejos pre-replicativos están ya montados sobre los sitios de replicación temprana sin que se produzca replicación, excepto la de una pequeña proporción de células que comienza a saltarse el bloqueo del punto de chequeo. El S-temprano, que incluye la primera mitad de la fase S en la que replican los genes transcripcionalmente activos. El S-tardío, correspondiente a la segunda mitad de la fase S, periodo en el que replica el ADN heterocromatínico. Y el S-tardío/G2, que incluye una gran proporción de núcleos en G2 que ya han finalizado su replicación (Fig 26 a). Los controles de sincronización se realizaron mediante citometría de flujo y recuento de los distintos patrones de distribución de los sitios de replicación (Fig 26 a), ya que éstos son característicos para cada subperíodo de la fase S (véase el Apartado 4.2.1. de Resultados).





**Figura 26. Niveles de las proteínas AcMFP1 detectados con los sueros 288 y 91 a lo largo del ciclo celular de células meristemáticas de la raíz de cebolla.**

**(a)** Esquema de la sincronización celular con hidroxurea (HU) y de los momentos estudiados del ciclo celular. Se consideró hora cero (0h) el momento de retirada del tratamiento con HU. Se analizaron el G1-tardío / S-temprano: -1h, en presencia de HU; S-temprano: +2h; S-tardío: +5h; S-tardío / G2: +7h. Las imágenes de citometría de flujo del contenido de ADN muestran la evolución de la ola de células sincronizadas teñidas con Ioduro de Propidio. Los contenidos de ADN en G1 y G2 corresponden a 2C y 4C, respectivamente. Como control de la sincronización se reflejan los porcentajes de núcleos que replican en cada momento detectados por la incorporación de BrdU. Se indican entre paréntesis los patrones de distribución mayoritarios para los sitios de replicación, característicos de cada periodo de la fase S (ver Fig. 39). **(b)** Immunodetección en membrana de las proteínas con los sueros 288 y 91 en las fracciones S3 y nuclear correspondientes a cuatro poblaciones celulares sincronizadas en los tiempos -1h, +2h, +5h y +7h, sin detectarse variaciones significativas en las cantidades de proteína a lo largo del ciclo. La histona H1 teñida con rojo Ponceau se muestra como control de carga. Con una flecha roja se indica la banda de 90 KDa hiper-fosforilada y ligeramente retardada de las poblaciones sincronizadas en los tiempos +2h, +5h y +7h.

El análisis mediante inmunodetección en membranas demostró que las intensidades de las bandas AcMFP1 detectadas con los sueros 288 y 91 en las fracciones nucleares sincronizadas, no experimentaban variaciones importantes entre los cuatro puntos del ciclo celular (Fig 26 b). Tampoco se detectaron bandas en las correspondientes fracciones citoplasmáticas (datos no mostrados).

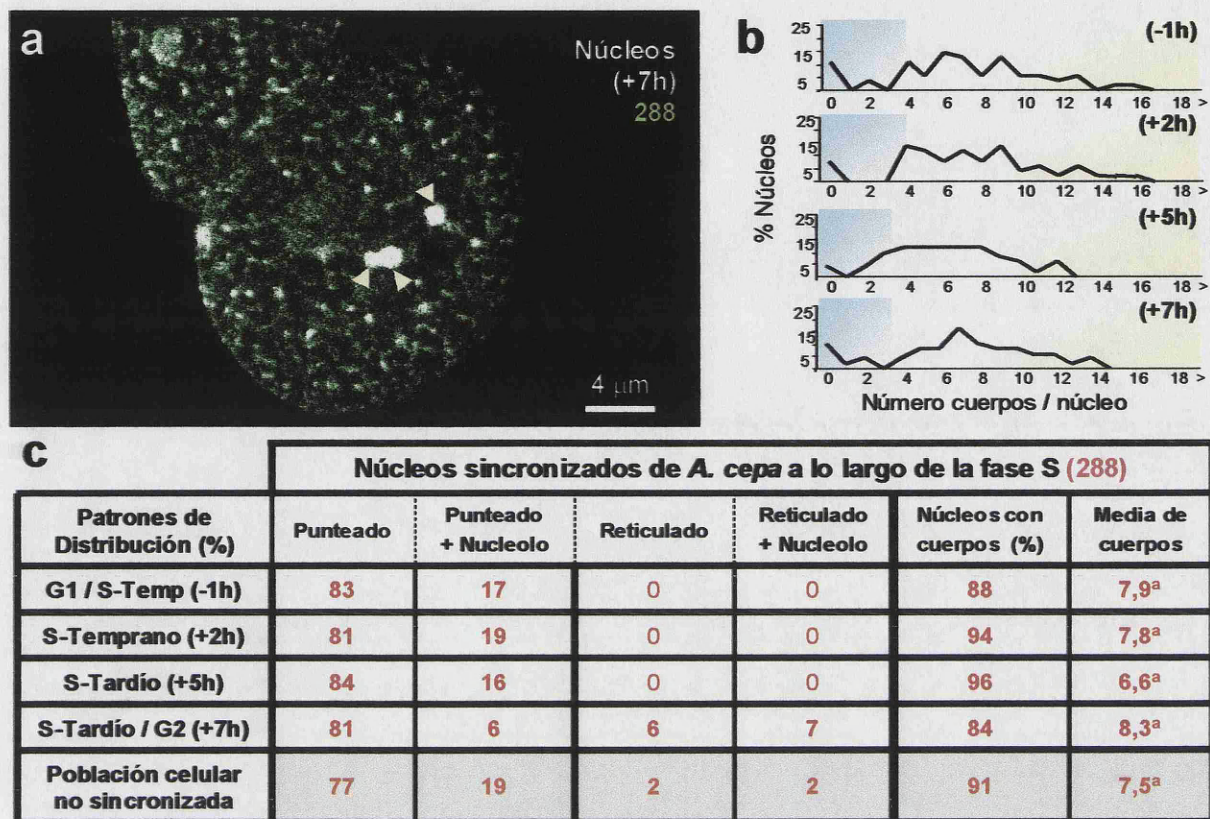
Para comprobar si la proteína de 90 KDa era fosforilada en determinadas fases del ciclo celular se investigó su presencia en los sobrenadantes S3, donde se recoge la proteína hiper-fosforilada, procedentes de la extracción de muestras sincronizadas en los cuatro momentos del ciclo celular.

Mediante inmunodetección en membrana con el suero 288 se detectó que la intensidad de la banda de 90 KDa hiper-fosforilada aumentaba progresivamente a lo largo del periodo S con una máxima intensidad en el S-tardío y G2 (Fig 26 b). Este resultado se confirmó al observar el ligero retardo de la forma hiper-fosforilada de la proteína en las fracciones nucleares en los mismos momentos del ciclo (Fig 26 b).

Aunque no se detectaron variaciones importantes en las cantidades de cada proteína durante la fase S, se analizó su distribución nuclear mediante IF para detectar los posibles movimientos de las mismas entre subcompartimentos nucleares, indicativos de su papel fisiológico.

Nuestros resultados demostraron que el número de cuerpos nucleares marcados con el suero 288 no experimentaba variaciones significativas a lo largo del ciclo celular en relación a los de núcleos no sincronizados (Fig 27 b, c). Aparentemente, no se observaron diferencias significativas en la distribución intranuclear de las proteínas desde G1/S-temprano hasta el final del S, donde todos los núcleos mostraban un patrón punteado. Solamente en el periodo S-tardío/G2 (+7h) se observó un patrón *reticulado* en el nucleoplasma en el 13% de los núcleos (Fig 27 a, c), indicando una posible redistribución de la proteína antes de la entrada en mitosis.



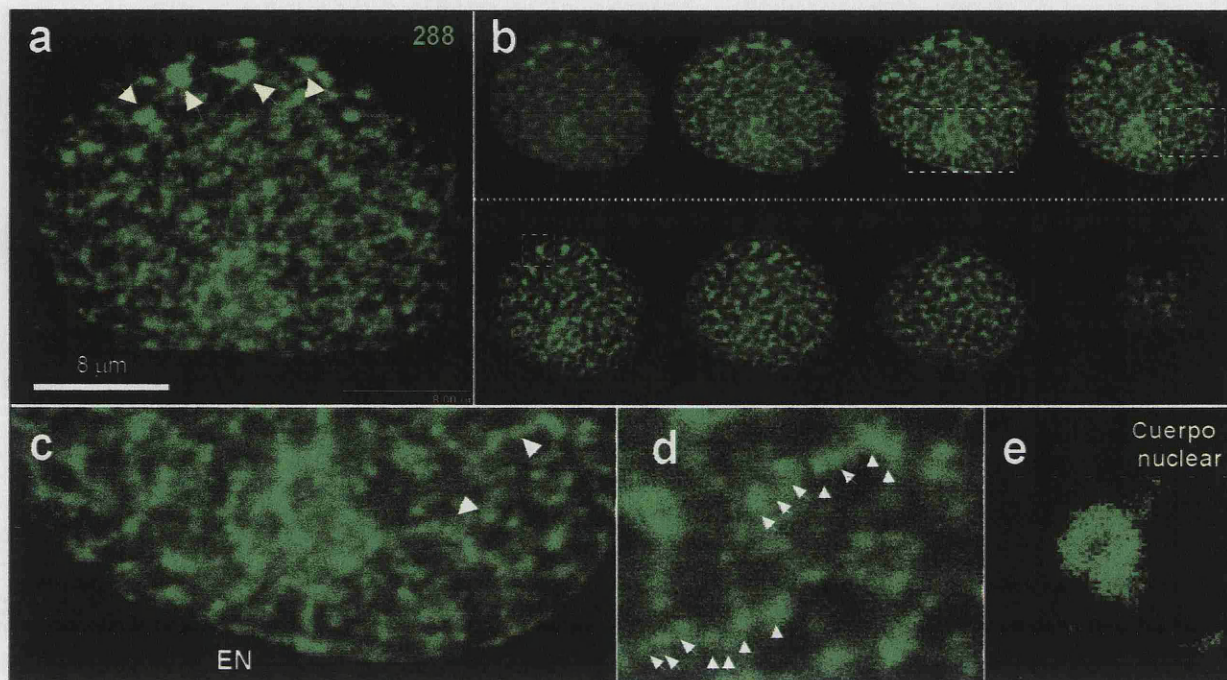


**Figura 27.** Distribución nuclear de las proteínas AcMFP1 detectadas con el suero 288 a lo largo del ciclo celular.

(a) Núcleos pertenecientes a una población celular sincronizada en S-tardío/G2 incubados con el suero 288. El marcado se detecta en cuerpos nucleares (flechas), en el nucleolo (No) y en numerosos focos brillantes que forman un patrón *reticulado* de distribución. (b) Representación de las frecuencias de núcleos (y) con distintos números de cuerpos marcados (x) de poblaciones celulares sincronizadas en las fases G1-tardío/S-temprano, S-temprano, S-tardío y S-tardío/G2. También se muestran los recuentos obtenidos de la población celular no sincronizada. (c) Tabla de frecuencias de los patrones de distribución a lo largo del ciclo celular. Las medias de cuerpos por núcleo marcado sincronizado y no-sincronizado no mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), como indica la presencia de una misma letra en el superíndice.

El patrón *reticulado* estaba constituido por focos de tamaño similar a los del modelo *punteado*, pero la mayoría se observaban alineados sobre el retículo del nucleoplasma, apareciendo extensas zonas sin marcado (Fig 28 a, b, c, d). Sin embargo, los focos asociados a la envoltura nuclear o el nucleolo no presentaron variaciones (Fig 28 c). Las diferencias entre ambos modelos *punteado* y *reticulado* se aprecian con más facilidad en los cortes virtuales tomados mediante microscopía confocal, que en sus proyecciones (compárense las Figs 23 a y 28 a, con 23 b y 28 b).





**Figura 28. Patrón reticulado de distribución de las proteínas AcMFP1 detectado con el suero 288.**

(a) Imagen correspondiente a la proyección de diez cortes virtuales tomados mediante microscopía confocal de fluorescencia. El inmunomarcado se acumula en numerosos focos fluorescentes distribuidos por el núcleo que adoptan un patrón *reticulado* discontinuo y en cuerpos nucleares de tamaño variable. También se observa un marcado más débil en el nucleolo. Barra: 8 μm. (b) Sucesión de cortes virtuales tomados cada micra a lo largo del eje z del núcleo anterior. (c, d y e) Detalles del núcleo anterior a mayor aumento mostrando la distribución del marcado en el nucleolo (c), las alineaciones de focos del patrón *reticulado* (flechas) (d) y de un cuerpo nuclear (e).

#### • Distribución de las proteínas en la matriz nuclear de células proliferantes

La distribución de las proteínas detectadas con los sueros 288 y 91 en las matrices nucleares (MN) y en las fracciones intermedias obtenidas durante su preparación (F1 y F2), se analizó en paralelo mediante inmunodetección en membrana, IF y microscopía confocal.

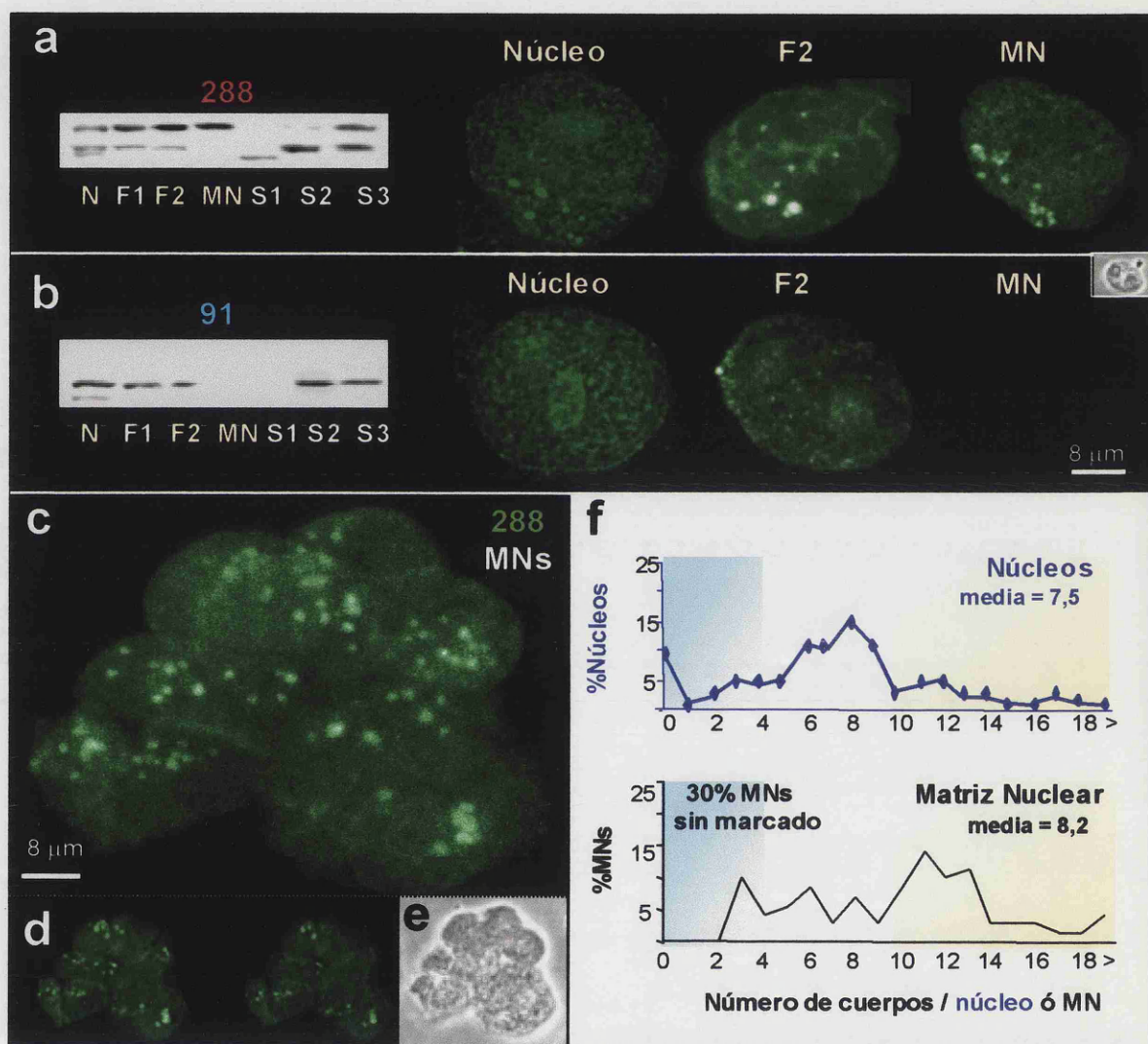
La extracción total de la banda inferior del doblete de 78 KDa con Triton X-100 no supuso ningún cambio visible en la distribución del marcado con el suero 288 entre núcleos y fracciones F1 (imagen no mostrada).



A su vez, la extracción parcial de la banda superior del doblete, detectada con ambos sueros, correlaciona con un importante descenso del marcado punteado y la detección de un patrón difuso en las fracciones F2, llegando a desaparecer simultáneamente la banda y el marcado punteado en la matriz nuclear (Fig 29 a, b).

La proteína AcMFP1 detectada con el suero 288 en la matriz nuclear corresponde a los estados hipo-fosforilados de la proteína de 90 KDa, que se distribuyen en cuerpos nucleares brillantes y de forma difusa por el retículo de la MN (Figs 29 c, d, e). La extracción con NaCl de las formas hiper-fosforiladas no produce una reducción en el tamaño o en el número de los cuerpos brillantes de la MN, sino que produce una pérdida total de marcado en el 21% de las MNs, correspondiente a la diferencia entre el 30% de MNs sin cuerpos marcados y el 9% de los núcleos (Fig 29 f), que es estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

En conjunto, todos estos resultados demuestran por las formas hipo-fosforiladas de la proteína de 90 KDa se distribuyen por el retículo de la MN y se acumulan en cuerpos nucleares anclados a la misma, superponiéndose en los núcleos el marcado de la proteína de 78 KDa distribuida en focos brillantes, en el nucleolo y también de forma dispersa por el retículo del nucleoplasma.



**Figura 29. Distribución de las proteínas AcMFP1 en las fracciones N, F2 y MN de células meristemáticas de la raíz.**

**(a y b)** Solubilidad de las bandas detectadas con los sueros 288 (a) y 91 (b) durante el proceso de extracción de MNs mediante inmunodetección en membrana, y distribución de las mismas en las fracciones insolubles correspondientes detectadas mediante IF con los mismos sueros. La proteína de 90 KDa se encuentra enriquecida en las MNs, mientras que la de 78 KDa es indetectable en esta fracción. El inserto en (b) muestra la imagen de contraste interferencial de la MN correspondiente.

**(c)** Proyección de diez cortes virtuales tomados mediante microscopía confocal de fluorescencia, de un grupo de matrices nucleares aisladas (MN) incubadas con el suero 288, mostrando la imagen del marcado en la fracción. **(d)** Imágenes correspondientes a dos cortes centrales de las mismas MNs. **(e)** Imagen de las mismas tomada mediante contraste interferencial. **(f)** Comparación de las frecuencias de cuerpos marcados en núcleos y MNs. Nótese que el 30% de las MNs no muestra marcado con el suero 288.

### 3.1.2. Inmunomarcado con oro y microscopía electrónica

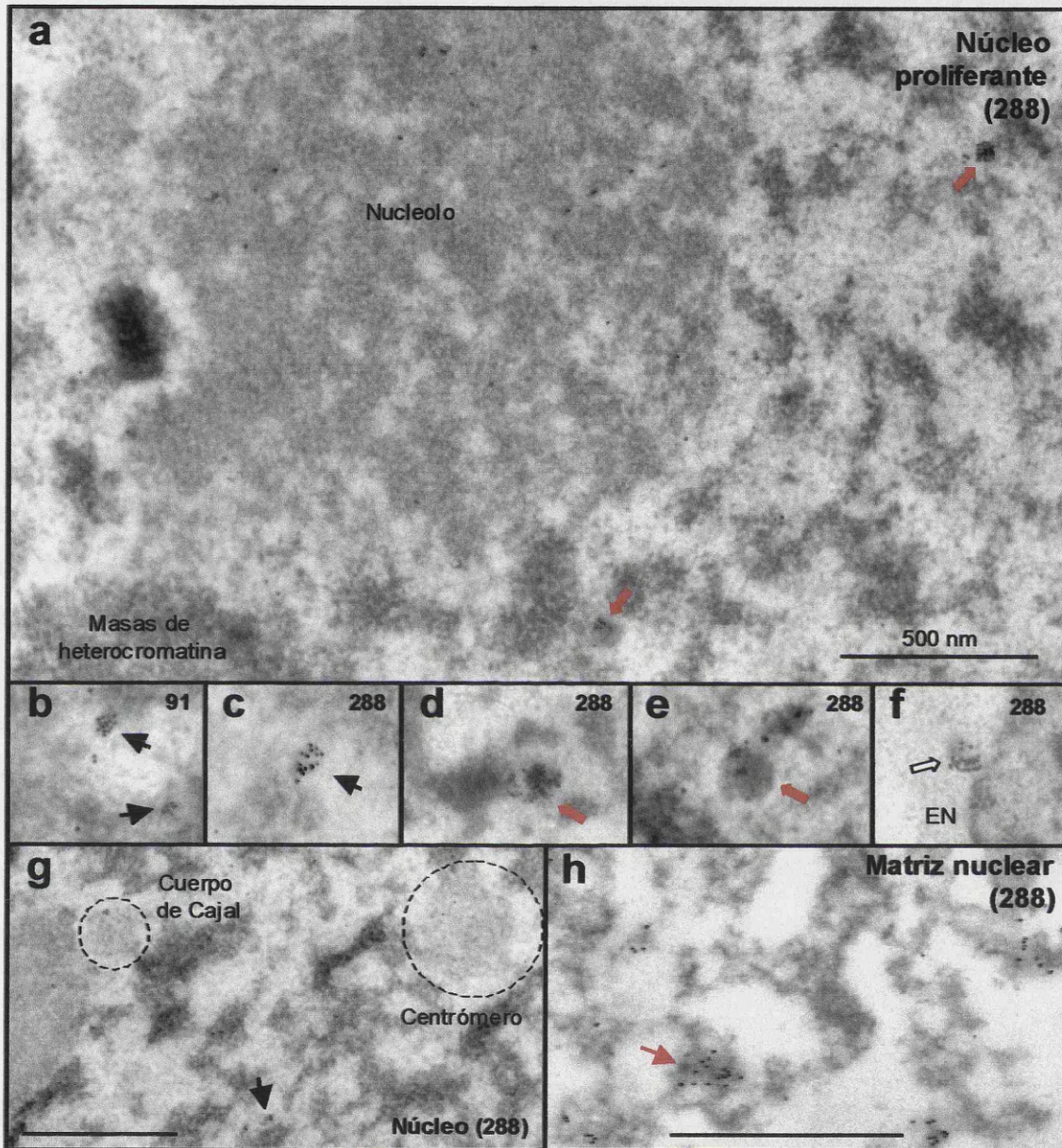
El análisis mediante inmunomarcado para microscopía electrónica de transmisión (ME), demostró que el marcado con el suero 288 se distribuía en tres subdominios nucleares correspondientes a los patrones observados mediante IF. Cuerpos nucleares con alta densidad de marcado, localizados en las regiones intercromatínicas y correspondientes a los cuerpos brillantes fluorescentes. Estructuras laxas de tamaño variable asociadas a la periferia de las masas de cromatina condensada, con una densidad de marcado menor que podrían corresponder a los focos del patrón *punteado* de IF, y un marcado disperso por el nucleolo y el nucleoplasma, principalmente en las regiones intercromatínicas (Fig 30 a, c, d).

Los cuerpos de AcMFP1 tienen una organización estructural distinta a la de los principales cuerpos o estructuras nucleares descritas en plantas: cuerpos de Cajal, cuerpos fibrilares y estructuras centroméricas, donde no se detectó marcado significativo con los sueros anti-MFP1 (Fig 30 g). Los cuerpos AcMFP1 son densos, de tamaño variable y en la mayoría de los casos menor al de todas ellas.

Su número varía enormemente en función del tipo celular, y en ningún caso coincide con el de los cuerpos de Cajal ni con el de las estructuras centroméricas. Presentan sin embargo similitud estructural con los cuerpos densos donde se acumulan proteínas fosforiladas (Samaniego, 1999). Los cuerpos densos aparecen marcados en matrices nucleares aisladas, donde también se detectaron partículas de oro distribuidas por el retículo de la matriz (Fig 30 h). Estos resultados concuerdan con el marcado observado en cortes sin resina, donde el suero detecta la proteína en los agregados densos y los filamentos del nucleoesqueleto (Samaniego *et al*, 2001; Samaniego, 1999).

El suero 288 también detectó marcado en el citoplasma, en unas estructuras redondeadas localizadas en la parte externa de la membrana nuclear y a menudo conectadas con ella (Fig 30 f).





**Figura 30. Distribución subnuclear de las proteínas AcMFP1 en células meristemáticas de la raíz analizada mediante inmunomicroscopía de alta resolución.**

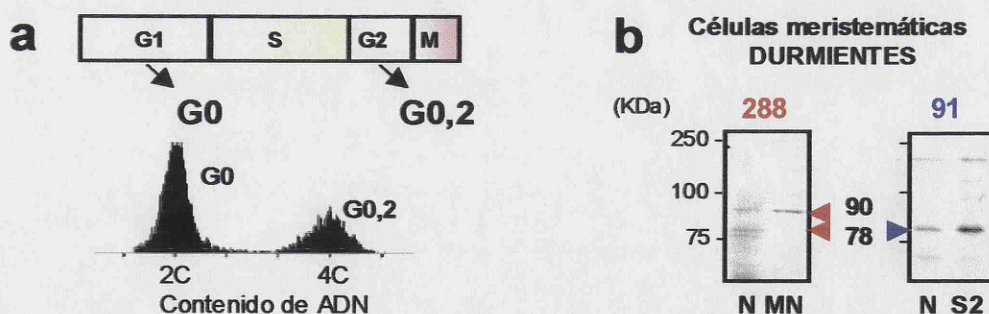
**a-g:** En el núcleo las proteínas reconocidas por el suero 288 localizan en cuerpos nucleares densos de tamaño variable (**a**, **d**, **e**) con una alta densidad de partículas de oro (flechas rojas), y en la región intercromatínica y el nucleolo con un marcado disperso (**a**). El suero 91 no marca los cuerpos densos, pero sí unas estructuras nucleares laxas (flechas) localizadas en la periferia de la cromatina (**b**), que también se marcan con el suero 288 (**c**). (**f**) Estructuras citoplasmáticas marcadas con 288 (flecha blanca) localizadas frecuentemente en la parte externa de la envoltura nuclear (EN). (**g**) Los cuerpos de Cajal y centrómeros no presentan un marcado significativo con el suero 288. **h:** En la matriz nuclear el marcado con el suero 288 se distribuye por el retículo de la matriz interna, con acumulaciones en zonas que podrían corresponder a los cuerpos nucleares de AcMFP1 (flecha roja). Barras: 500 nm.



En concordancia con los resultados de IF, se observó marcado con el suero 91 en estructuras laxas asociadas a las masas de heterocromatina, pero no en los cuerpos nucleares densos, y también de forma difusa por el núcleo y el nucleolo (Fig 30 b).

### 3.2. Distribución de las proteínas en células meristemáticas durmientes

Se estudió la presencia de las proteínas AcMFP1 en células meristemáticas quiescentes (G0) de raíz mediante inmunodetección en membranas e IF. Estas células se encuentran entre el primer y segundo milímetro del ápice de las raíces no brotadas de bulbos de cebolla. Mediante citometría de flujo se demostró que las células habían abandonado el último ciclo celular proliferante durante las fases G1 ó G2, ya que poseían contenidos de ADN 2C (G0) y 4C (G0,2). El porcentaje de células con contenidos de ADN intermedios apenas llegaba al 3% (Fig 31 a), comparado con el 30% que presentaba estos contenidos en las células proliferantes (Fig 33).

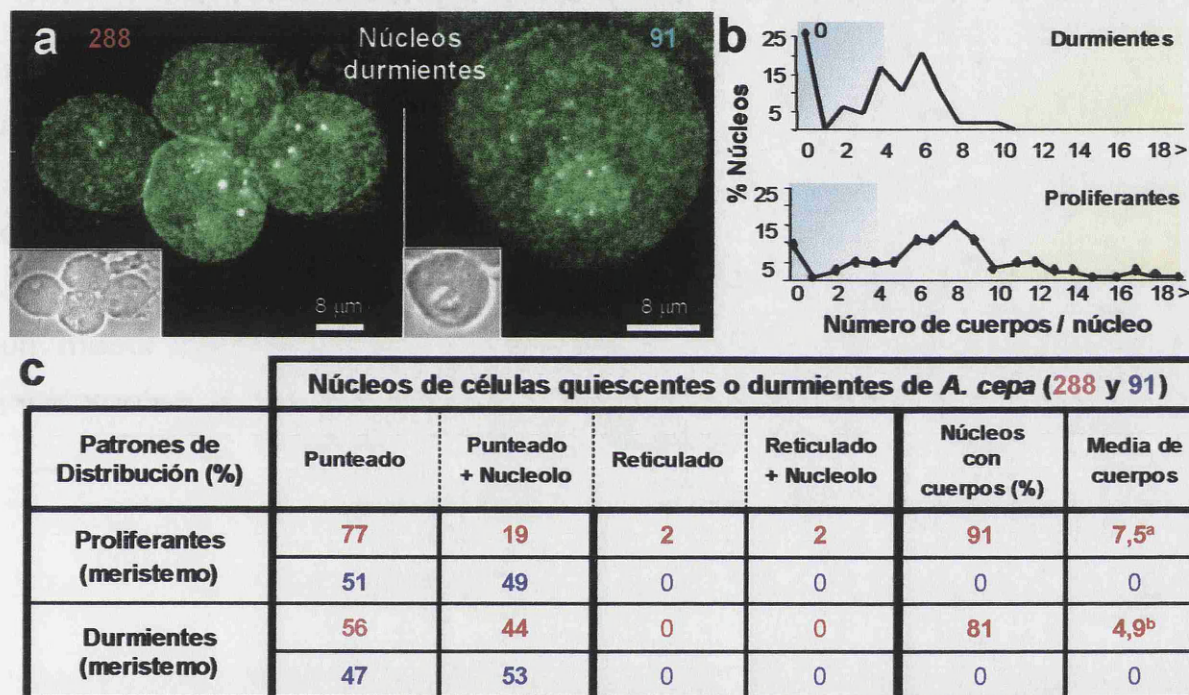


**Figura 31. Identificación de las proteínas AcMFP1 con los sueros 288 y 91 en fracciones de células durmientes del blastema radicular del bulbo de cebolla.**

**(a)** Valoración del contenido de ADN mediante citometría de flujo en núcleos aislados de células durmientes de blastemas radiculares del bulbo. Se distinguen dos poblaciones celulares durmientes, una mayoritaria con contenido 2C de ADN (G0), y otra con contenido 4C (G0,2), sin células en replicación con contenidos intermedios de ADN. **(b)** Inmunodetección en membrana de las proteínas AcMFP1 en células durmientes, con el suero 288 en fracciones de núcleos y MNs aisladas, y con el suero 91 en fracciones nucleares y el sobrenadante S2.



Se demostró mediante inmunodetección en membrana con el suero 288 que tanto el doblete de 78 KDa, como la banda de 90 KDa estaban presentes en las fracciones de núcleos durmientes. Esta última banda también aparecía en la fracción de MN (Fig 31 b). Con el suero 91, se detectó la banda correspondiente de 78 KDa en la fracción de núcleos durmientes y en el sobrenadante S2, así como su forma polimerizada de 160 KDa (Fig 31 b).



**Figura 32. Distribución de las proteínas AcMFP1 en células durmientes de cebolla.**

**(a)** Núcleos durmientes incubados con los sueros 288 y 91 respectivamente. El marcado con 288 se acumula en los cuerpos nucleares, distribuyéndose también por el nucleolo (No) y en numerosos y pequeños focos fluorescentes que adoptan un patrón *punteado* de distribución. El marcado del suero 91 también sigue el patrón *punteado* y se acumula en el nucleolo, pero no en cuerpos. Se muestran las correspondiente imágenes de contraste interferencial. **(b)** Representación de las frecuencias de cuerpos marcados con MFP1 en células meristemáticas proliferantes o durmientes. **(c)** Tabla comparativa resumen de las frecuencias de los patrones de marcado con los sueros 288 y 91 en núcleos meristemáticos proliferantes o durmientes. Las medias reflejan el número de cuerpos por núcleo marcado con 288, los superíndices a y b muestran diferencias significativas entre ambos tipos celulares ( $p < 0,05$ ).

Los resultados de IF con el suero 288 demostraron que las proteínas AcMFP1 tienen en núcleos durmientes un patrón de distribución *punteado* semejante al descrito en núcleos proliferantes, con algunas diferencias cuantitativas como un

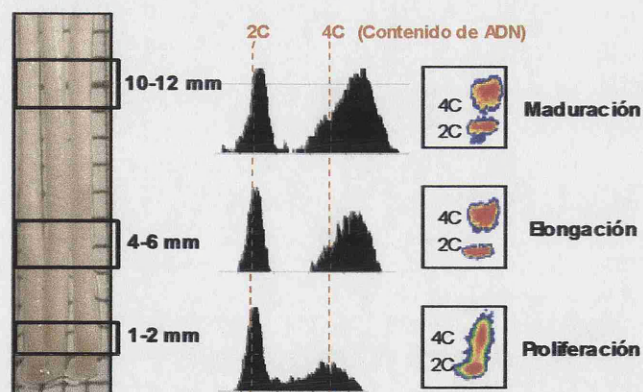


menor número de puntos fluorescentes y una mayor proporción de núcleos con marcado nucleolar adicional, el 44% en células durmientes frente al 21% de las proliferantes (Fig 32 a, c).

La principal diferencia se detectó en los cuerpos nucleares: el 25% de los núcleos durmientes carecía de cuerpos marcados, frente al 9% de núcleos proliferantes.

Además, la media de cuerpos por núcleo durmiente *marcado* era significativamente menor que de la de núcleos proliferantes, 4,9 y 7,5, respectivamente (Fig 32 b, c).

Con el suero 91 no se detectaron diferencias de marcado importantes ni cualitativas ni cuantitativas respecto a las células proliferantes, a excepción de un menor número de focos fluorescentes (Fig 32 a, c). Como en núcleos proliferantes, se detectó un marcado ocasional en focos de mayor tamaño.



**Figura 33. Contenidos de ADN de las poblaciones celulares de distintas zonas de la raíz de cebolla.**

Los contenidos de ADN se calcularon mediante citometría de flujo en poblaciones celulares cuyos núcleos se habían teñido previamente con yoduro de propidio. En la zona meristemática, localizada entre el primer y segundo milímetro apical, se detectaron hasta un 30% de células en replicación con contenidos de ADN intermedios entre 2C y 4C. En la zona de elongación, entre los milímetros cuarto y sexto, las células muestran contenidos de ADN 2C ó 4C, pero no valores intermedios, indicando que no están en proliferación. Los valores mayores de 4C corresponden a células cuyo genoma está endoreplicando. En la zona de maduración entre los milímetros 10 y 12 desde el ápice radicular las células muestran contenidos 2C, 4C y superiores, observándose valores intermedios indicativos de endoreplicación. Se muestra una fotografía de tres raíces alineadas sobre una superficie milimetrada utilizada en la escisión de las zonas recuadradas.

### **3.3. Expresión y distribución de las proteínas AcMFP1 en células diferenciadas de raíz**

Se estudiaron mediante inmunodetección en membrana e IF los niveles y la distribución de las proteínas AcMFP1 en fracciones nucleares de distintos tipos celulares del eje radicular.

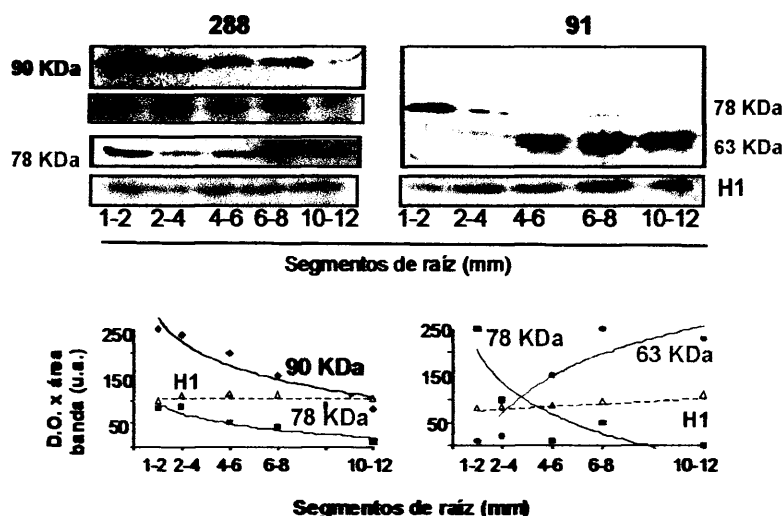
En el bulbo de cebolla, la zona meristemática se sitúa entre el primer y segundo milímetro del extremo apical de la raíz. La zona de elongación del segundo al sexto milímetro, donde las células no se dividen y comienzan a crecer longitudinalmente y a diferenciarse. La zona de maduración se extiende a partir del sexto milímetro, en ella las células dejan de elongarse alcanzando la madurez funcional (Beemster *et al*, 2003).

Mediante citometría de flujo se comprobó que el perfil de ADN en el paquete meristemático era el correspondiente a proliferación, con un ~30% de las células con contenidos de ADN intermedios entre 2C y 4C, indicando que estaban en replicación activa en el periodo S. Las células de la zona de elongación entre el cuarto y sexto milímetro mostraban exclusivamente valores 2C ó 4C de ADN, indicando que no había síntesis de ADN ni proliferación celular. Entre los milímetros diez y doce de la zona de maduración existe una alta proporción de núcleos con un contenido de ADN mayor de 4C, indicando la aparición de procesos de endoreplicación asociado a la diferenciación de algunos tejidos de plantas (Fig 33).

Para valorar los niveles de las proteínas AcMFP1 en las tres zonas descritas de la raíz, se comparó la intensidad de las bandas de 78 y 90 KDa detectadas en las correspondientes fracciones nucleares identificadas con ambos sueros. Con el suero 288 se observó que sus niveles decrecían gradualmente desde la zona meristemática hacia las zonas de diferenciación (Fig 34), mientras que la intensidad de la banda control correspondiente a la histona H1 teñida con rojo



Ponceau apenas variaba a lo largo del eje radicular, aumentando ligeramente en la zona de maduración debido a la mayor proporción de núcleos con contenidos de ADN  $\geq 4C$  (Fig 34).

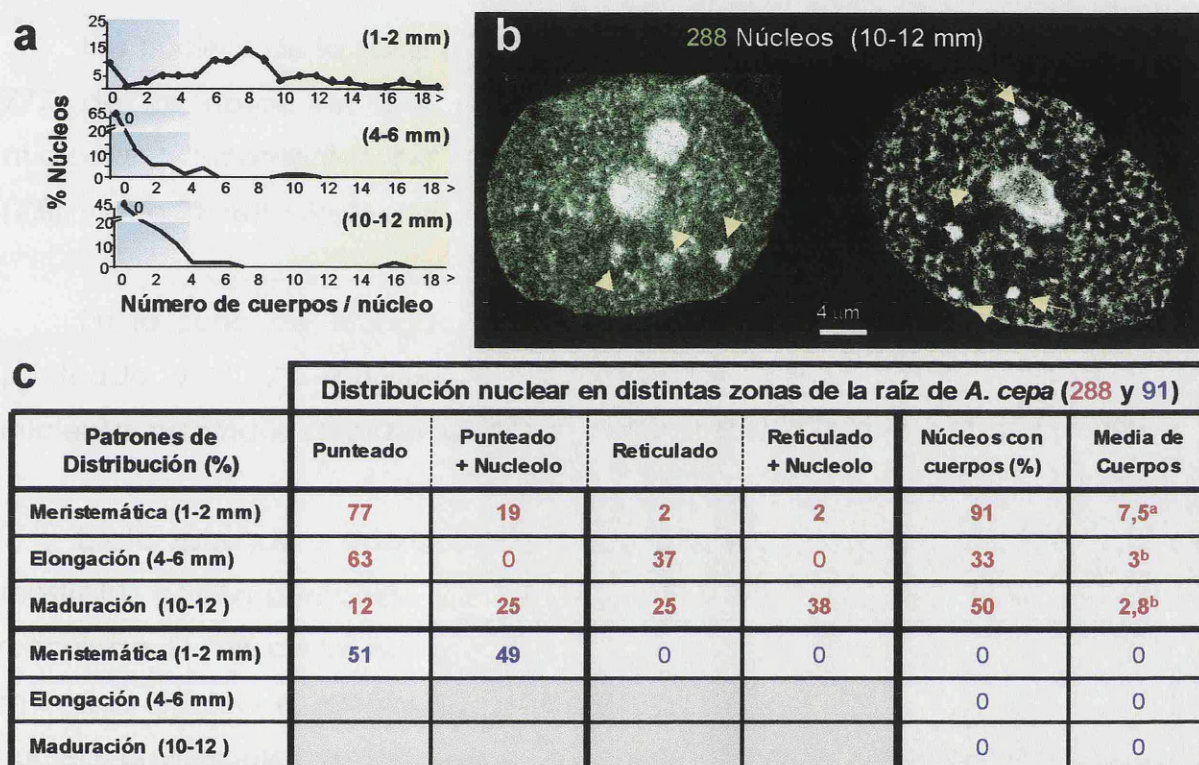


**Figura 34. Niveles de las proteínas AcMFP1 en distintas zonas de la raíz de cebolla.**

Se estudiaron los niveles de las proteínas en fracciones nucleares obtenidas de distintas zonas de la raíz de cebolla, concretamente las comprendidas entre los milímetros 1-2, 2-4, 4-6, 6-8 y 10-12. Los niveles se valoraron mediante la cuantificación de las bandas detectadas con los sueros 288 y 91. Los niveles de las proteínas de 90 KDa y 78 KDa detectados con el suero 288 fueron máximos en la zona meristemática, decreciendo al alejarse del ápice de la raíz. El suero 91 detectaba una banda abundante de 78 KDa en la zona meristemática, que no aparece en las zonas de elongación y maduración de la raíz. Simultáneamente con la desaparición de esta banda se observó la aparición de un intenso doblete de 63 KDa en estas zonas. Como control de carga se valoraron los niveles de la histona H1 teñida con rojo Ponceau en las mismas membranas. Las representaciones enfrentan los niveles de las proteínas, valoradas por su Densidad Óptica x Área (y), con las zonas de la raíz (x) comprendidas entre los milímetros 1-2, 4-6 y 10-12, correspondientes a las zonas meristemática, de elongación y maduración.

El comportamiento de las bandas reconocidas por el suero 91 fue distinto del caso anterior. La gran intensidad de la banda de 78 KDa en la zona meristemática, decrecía bruscamente en la zona de elongación hasta prácticamente desaparecer en la de maduración. Sorprendentemente, el suero 91 detectaba un doblete de aproximadamente 63 KDa de gran intensidad a partir del cuarto milímetro de la raíz, que aumentaba progresivamente coincidiendo con la bajada de la proteína de 78 KDa (Fig 34).

En paralelo al estudio de los niveles de las proteínas se analizó su distribución nuclear mediante IF a lo largo del eje radicular, utilizando fracciones de núcleos aislados correspondientes a las zonas meristemáticas (milímetros 1-2), elongación (4-6) y maduración (10-12).



**Figura 35.** Distribución nuclear de las proteínas detectadas con los sueros 288 y 91 en las distintas zonas de la raíz de cebolla.

**(a)** Representación de las frecuencias de núcleos (y) con distinto número de cuerpos marcados (x) en las zonas meristemática, de elongación y maduración de la raíz de cebolla, situadas respectivamente entre los milímetros 1-2, 4-6 y 10-12. **(b)** Núcleos de la zona de maduración incubados con el suero 288 que muestran los patrones de distribución *punteado* (izquierda) y *reticulado* (derecha), junto al marcado nucleolar (No) y los cuerpos nucleares (flechas). **(c)** Tabla comparativa de las frecuencias de los patrones de marcado detectados con los sueros 288 y 91 en las distintas zonas radiculares. Las medias reflejan el número de cuerpos por núcleo *marcado* con 288, detectándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la media de los núcleos meristemáticos y las del resto de las zonas, indicado mediante letras diferentes en el superíndice. El suero 91 no reconoce los cuerpos ni presenta los patrones *punteado* ni *reticulado* en las zonas de elongación y maduración, véase la siguiente Figura.

El patrón de distribución de las proteínas detectadas con el suero 288 fue distinto en las tres zonas estudiadas de la raíz. Se detectó un importante y significativo descenso del número de cuerpos nucleares enriquecidos en la

proteína de 90 KDa desde la zona meristemática (media de 7,5) a las zonas de células diferenciadas de la raíz (2,9), donde una alta proporción de los núcleos (50-65%) carecía de cuerpos marcados (Fig 35 a, c). Este descenso coincidía con la gradual pérdida de intensidad de la banda de 90 KDa detectada con el suero 288 mediante inmunodetección en membrana (Fig 34).

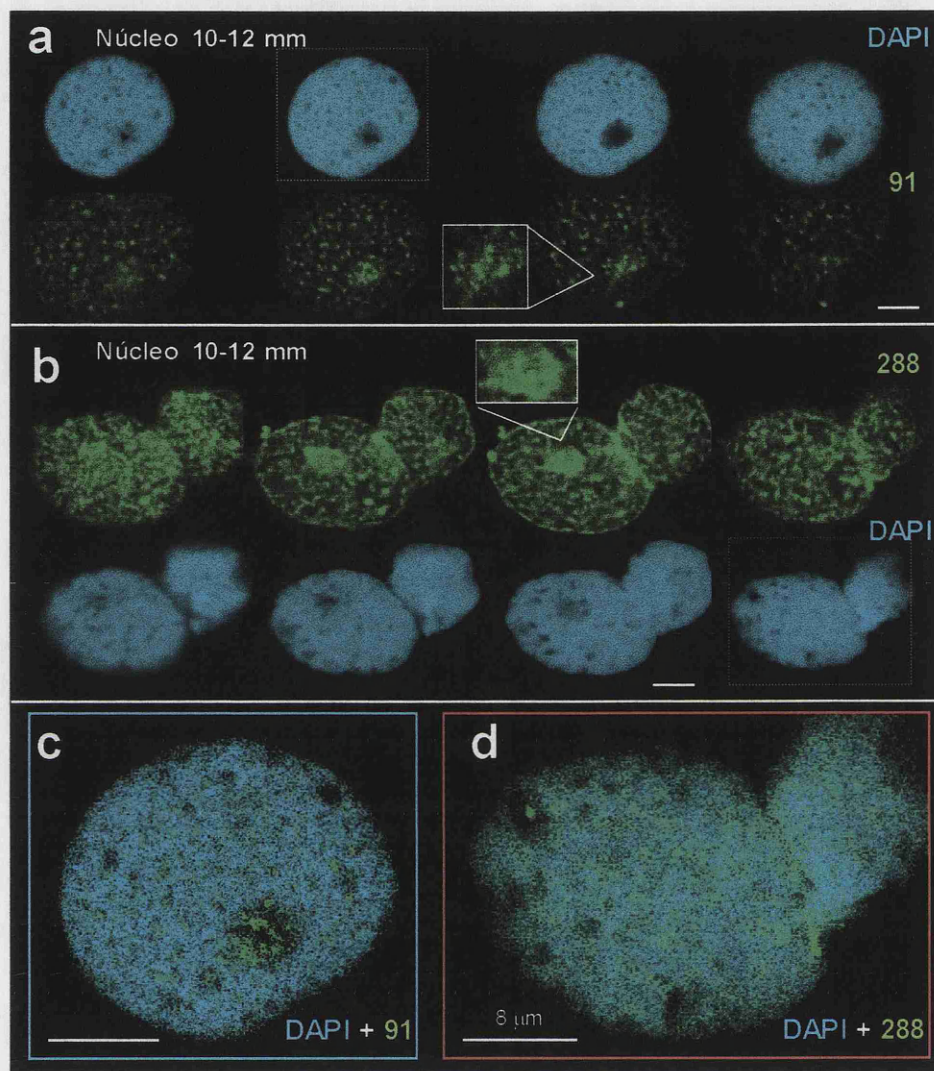
Los núcleos de la zona meristemática mostraron un patrón *punteado* en el 77% de los casos, un 19% presentaba un patrón *punteado* con marcado nucleolar, y solamente una baja proporción presentaba el patrón *reticulado* (2%), y otro 2% *reticulado* con marcado nucleolar adicional (Fig 35 c).

En la zona de elongación, el 63% de los núcleos mostraba un patrón *punteado*, y el 37% restante lo mostraba *reticulado*. No se detectó marcado nucleolar en ningún caso en esta zona de la raíz (Fig 35 c).

En la zona de maduración los valores se invertían, el 37% de los núcleos mostraba patrón *punteado*, mientras que el 63% restante presentaba el patrón *reticulado*. El 70% de los núcleos de la zona de maduración mostraba un intenso marcado nucleolar, proporción bastante mayor que el 21% detectado en los núcleos proliferantes del meristemo (Fig 35 b, c).

También varió la distribución de las proteínas detectada con el suero 91 en las zonas de elongación y maduración. Se detectó un patrón de marcado distinto de los patrones *punteado* y *reticulado* descritos hasta el momento (Figs 23, 28, 36 b), y constituido por agrupaciones de focos brillantes distribuidos por las regiones intercromatínicas y el nucleolo (Fig 36 a), como demuestra la tinción simultánea con DAPI (Fig 36 c), mientras que los puntos del marcado *reticulado* detectados en los mismos núcleos con el suero 288 están más extendidos y solapan con la tinción con DAPI en la parte exterior de las masas de cromatina (Fig 36 d).



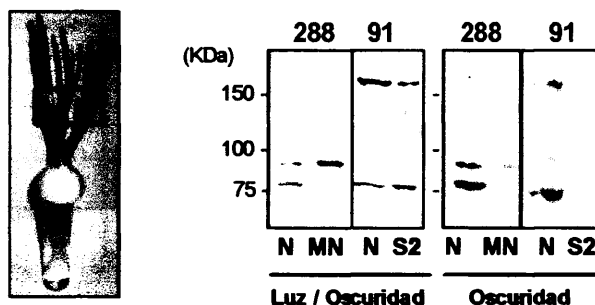


**Figura 36. Distribución nuclear de las proteínas detectadas con los sueros 288 y 91 en las zonas de elongación y maduración de la raíz de cebolla.**

**(a)** Cortes virtuales consecutivos tomados mediante microscopía confocal, correspondientes a un núcleo de la zona de maduración radicular incubado con el suero 91 y teñido con DAPI. El marcado está constituido por pequeños focos dispersos por el interior del núcleo y el nucleolo (ampliado), pero no corresponde exactamente a los denominados patrones *punteado* ni *reticulado* del suero 288. **(b)** Serie de cortes virtuales análogos correspondientes a núcleos de la misma zona incubados con el suero 288. En este caso los focos de marcado se distribuyen con un patrón *reticulado*, y el marcado del nucleolo parece más difuso (ampliado). **(c y d)** Superposición de los cortes centrales de los núcleos anteriores con DAPI y los correspondientes sueros. El marcado del suero 91 se acumula preferentemente en las zonas nucleares no teñidas con DAPI (regiones intercromatínicas) (c), mientras que el marcado del suero 288 además de ocupar estas regiones se superpone al DAPI en la periferia de las mismas (d). Barras: 8 μm.

### 3.4. Expresión y distribución de las proteínas AcMFP1 en hojas

Se analizaron los niveles de las proteínas y su distribución en núcleos de hojas crecidas en un ciclo solar de luz / oscuridad o sólo oscuridad. El suero 288 detectó las bandas de 78 y 90 KDa en las fracciones de núcleos aislados de las hojas crecidas en ambas condiciones lumínicas, y la banda de 90 KDa en las correspondientes fracciones de MN (Fig 37).



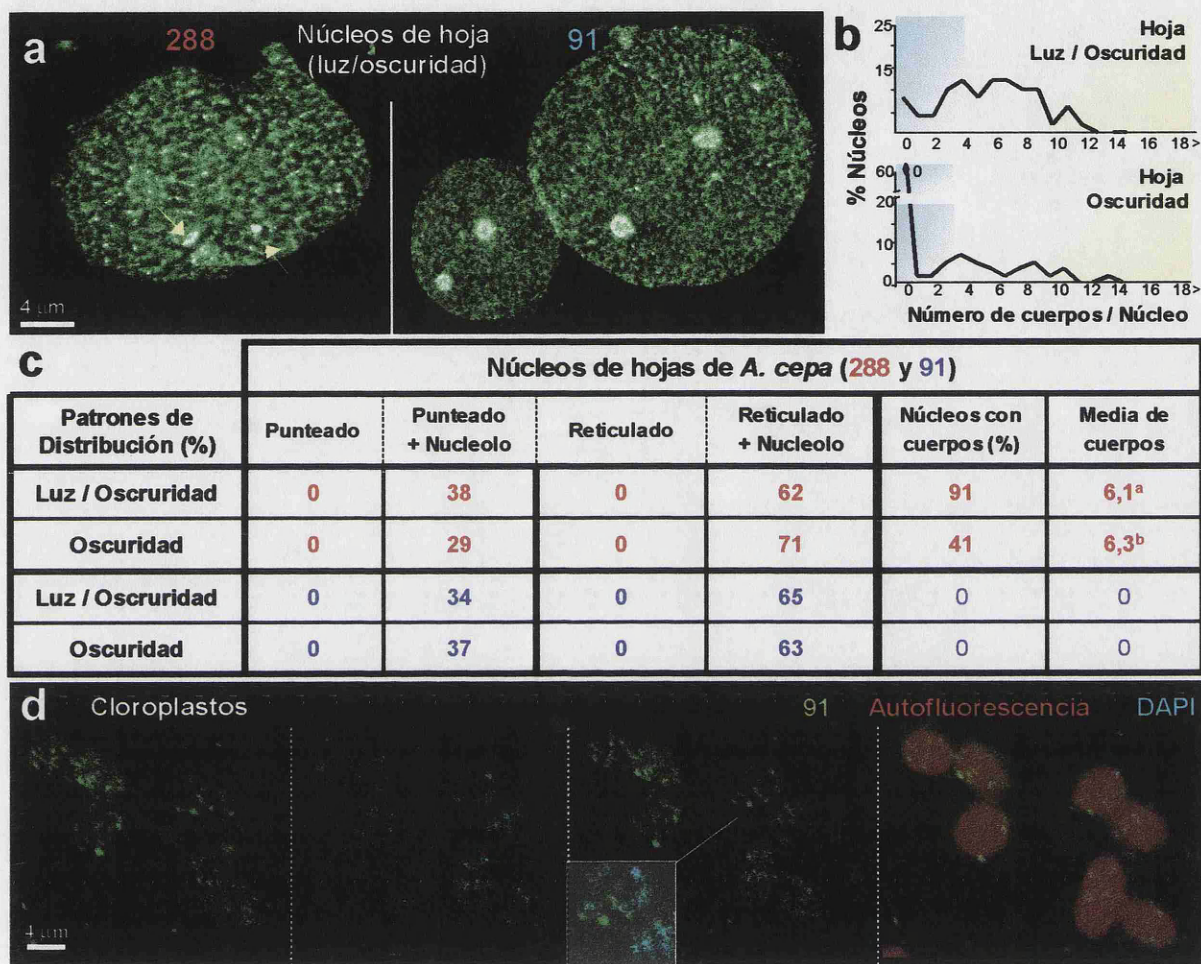
**Figura 37. Detección de las proteínas AcMFP1 en hojas de cebolla con los sueros 288 y 91.**

En la fotografía se encuadra la zona foliar utilizada para preparar las distintas fracciones subnucleares. en plantas crecidas en régimen de luz / oscuridad, el suero 288 detecta las bandas de 78 y 90 KDa en la fracción nuclear, y sólo la de 90 KDa en la MN. En sólo oscuridad la banda de 90 KDa es mucho menos intensa. El suero 91 detecta las bandas de 78 y 160 KDa en las fracciones nuclear y del sobrenadante S2 de plantas crecidas en presencia de luz / oscuridad, y en sólo oscuridad con menor intensidad en el sobrenadante S2.

El suero 91 detectó la banda de 78 KDa y su forma polimérica de ~160 KDa en las fracciones de núcleos aislados y en el sobrenadante S2 de hojas (Fig 37), independientemente de si las cebollas se habían cultivado en presencia o ausencia de luz, aunque la cantidad de proteína en hojas crecidas en oscuridad era menor.

La proteína de 78 KDa detectada mediante IF por ambos sueros 288 y 91 se distribuía con un patrón *reticulado* en más del 60% de los núcleos de hojas, mostrando un marcado punteado en el resto (Fig 38 b, c). En todos los casos se observó marcado nucleolar, de mayor intensidad con el suero 91 (Fig 38 b, c).





**Figura 38. Distribución subcelular de las proteínas AcMFP1 en hoja de cebolla.**

**(a)** Núcleos de hojas crecidas en presencia de luz incubados con el suero 288. El marcado más intenso con el suero 288 se acumula en los cuerpos nucleares (flechas), ligeramente en los nucleolos y en numerosos focos de pequeño tamaño que adoptan el patrón *reticulado* de distribución. Con el suero 91 se observa el patrón *reticulado* y un marcado nucleolar muy intenso.

**(b)** Representación de las frecuencias de cuerpos nucleares marcados (x) por núcleo (y) en células de hoja de cebolla crecidas en un ciclo solar de luz / oscuridad y en sólo oscuridad. **(c)** Tabla de distribución de los patrones de marcado nuclear detectados con 288 y 91 en hojas crecidas en un ciclo solar de luz / oscuridad y en sólo oscuridad. Las medias reflejan el número de cuerpos por núcleo marcado, habiéndose detectado diferencias significativas entre las proporciones celulares crecidas en luz/oscuridad y sólo oscuridad ( $p < 0,05$ ), como muestran los distintos superíndices. **(d)** Cloroplastos autofluorescentes (rojo) de un aplastado celular de hoja de cebolla incubado con el suero 91 (verde), cuyos nucleoides aparecen teñidos con DAPI (azul). La superposición de los canales verde y azul muestra que no existe co-localización preferente en los nucleoides, aunque ambos marcados se superponen por el resto del cloroplasto.

La ausencia de luz produjo un drástico descenso en el número de núcleos con cuerpos enriquecidos en la proteína de 90 KDa y marcados con el suero 288, aunque no variaba la media de cuerpos por núcleo marcado (Fig 38 a, c). La ausencia de luz sin embargo no afectaba a las frecuencias de los patrones de distribución detectados con ambos sueros, donde el marcado *reticulado-nucleolar* era siempre mayoritario (Fig 38 c).

MFP1 se localiza en los cloroplastos de *Arabidopsis*, por lo que se investigó su distribución en los cloroplastos de cebolla, utilizando preparaciones de aplastados celulares de hojas crecidas en presencia de luz. El suero 91 detectó AcMFP1 mediante IF en la gran mayoría de los cloroplastos (>95%), mostrando un marcado punteado y disperso por el retículo de los mismos (Fig 38 d). En estas muestras la mayoría de los núcleos no aparecían marcados, ya que los sueros anti-MFP1 no penetran fácilmente en su interior.

#### **4. RELACIÓN DE AcMFP1 CON OTROS DOMINIOS NUCLEARES**

Se investigó la distribución de las proteínas de 78 y 90 KDa en distintos subdominios funcionales del núcleo, analizando su co-localización con proteínas marcadoras de los mismos para tratar de establecer la relación funcional entre AcMFP1 y dichos subdominios, así como su posible implicación en la función o funciones que en ellos se desarrollan. Del mismo modo, si se demuestra la exclusión de las proteínas AcMFP1 de un determinado subdominio nuclear, se podría descartar que tuviera una función relacionada con la actividad nuclear que en él se desarrolla.

En concreto, se estudió la relación de AcMFP1 con los dominios de *splicing* co-transcripcional y los sitios de maduración de los snRNAs, así como con los focos de replicación de ADN.

##### **4.1. Dominios de *splicing* co-transcripcional y maduración de los snRNAs**

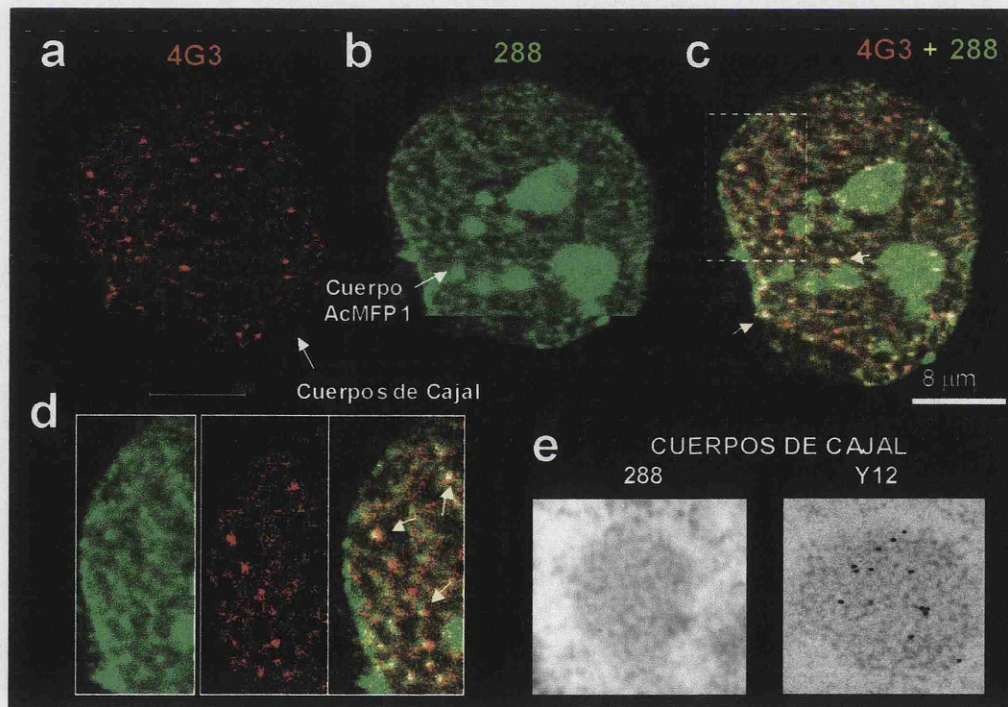
Se utilizaron los anticuerpos 4G3, específico contra la proteína U2B'' del espliceosoma, e Y12, que reconoce las proteínas Sm de las snRNPs, como marcadores específicos de los sitios de *splicing* co-transcripcional y maduración de los snRNAs. El anticuerpo 4G3 detecta mediante IF el retículo nucleoplásmico correspondiente a los sitios de *splicing* co-transcripcional, y numerosos cuerpos de Cajal distribuidos por el núcleo donde se produce la maduración de los snRNAs, cuyo número medio en células proliferantes de raíz de cebolla es de 27, alcanzando máximos de hasta 57 cuerpos de Cajal en un solo núcleo (Cui y Moreno Díaz de la Espina, 2002).

La incubación simultánea de núcleos proliferantes aislados de raíz con los anticuerpos 4G3 y 288, reveló que las proteínas U2B'' y AcMFP1 se distribuían en subdominios nucleares distintos. Mediante microscopía confocal (Fig 39 a, b, c) se observa claramente que los cuerpos de Cajal son distintos en tamaño y número que los cuerpos de AcMFP1, y sus proteínas marcadoras no co-localizan en



ninguna de las dos estructuras, aunque pueden observarse ocasionalmente zonas de co-localización en la periferia de algunos cuerpos de Cajal.

La ausencia de luz produjo un drástico descenso en el número de núcleos con cuerpos enriquecidos en la proteína de 90 KDa y marcados con el suero 288, aunque no variaba la media de cuerpos por núcleo *marcado* (Fig 38 a, c). La ausencia de luz sin embargo no afectaba a las frecuencias de los patrones de distribución detectados con ambos sueros, donde el marcado *reticulado-nucleolar* era siempre mayoritario (Fig 38 c).



**Figura 39. Relación topológica de las proteínas AcMFP1 con los dominios nucleares de transcripción / *splicing* en núcleos meristemáticos de raíz de cebolla.**

(a y b) Núcleos meristemáticos de la raíz de cebolla incubados simultáneamente con un marcador de *splicing*, el anticuerpo 4G3, que detecta la proteína U2B'' de la partícula U2 snRNP del espliceosoma (a), y el suero 288 (b). (c y d) Imágenes correspondientes a la superposición de los dos canales del núcleo anterior (c), y a una zona ampliada de la misma (d). La baja intensidad relativa del marcado de *splicing* se debe a la baja potencia del láser He-Ne utilizado (1,2 mW) en contraste con la del láser de argón utilizado para el verde (5 mW). Aunque ambos marcadores coinciden en las regiones intercromatínicas, la co-localización entre ellos no es significativa, aunque algunos cuerpos de Cajal se encuentran muy próximos a los puntos brillantes de AcMFP1 (flechas). (e) Mediante inmunomarcado con oro para ME se comprueba que los cuerpos de Cajal, que son dominios de maduración de las snRNPs, tienen una alta intensidad de marcado con el anticuerpo Y12, que detecta el dominio Sm de las proteínas de *splicing*, pero no con el 288.

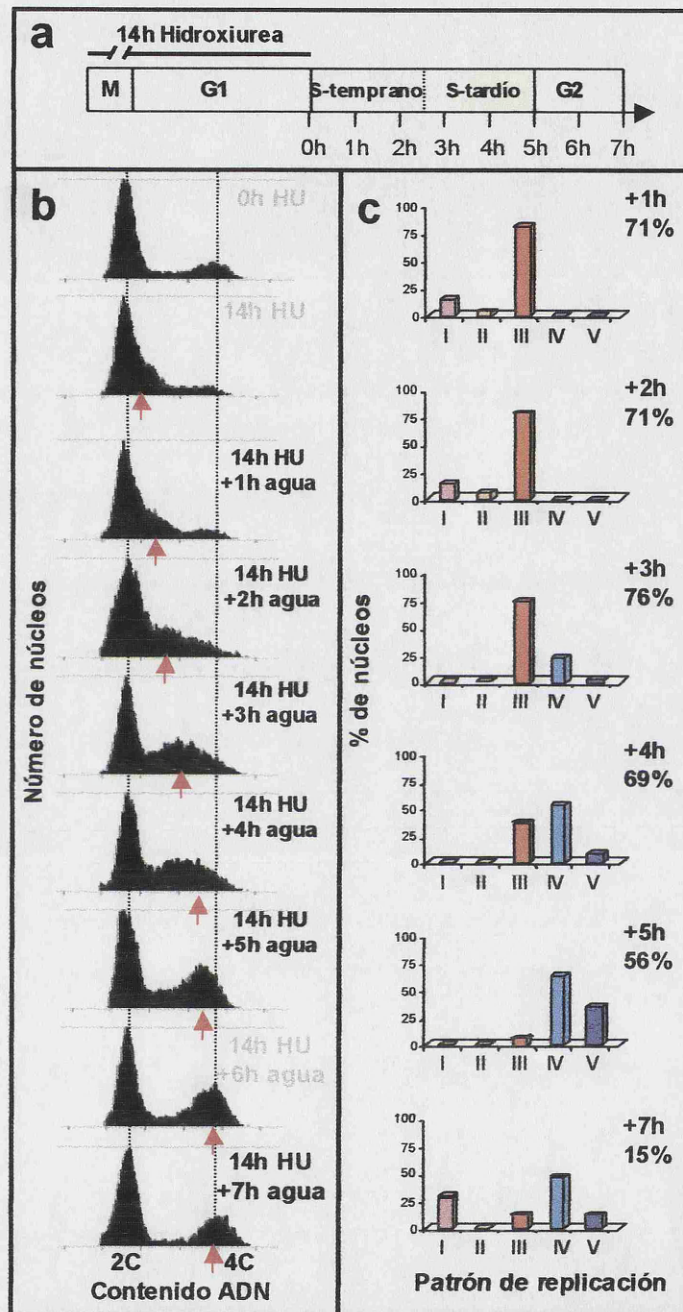
MFP1 se localiza en los cloroplastos de *Arabidopsis*, por lo que se investigó su distribución en los cloroplastos de cebolla, utilizando preparaciones de aplastados celulares de hojas crecidas en presencia de luz. El suero 91 detectó AcMFP1 mediante IF en la gran mayoría de los cloroplastos (>95%), mostrando un marcado punteado y disperso por el retículo de los mismos (Fig 38 d). En estas muestras la mayoría de los núcleos no aparecían marcados, ya que los sueros anti-MFP1 no penetran fácilmente en su interior.

#### **4.2. Focos de replicación**

De todos los modelos o patrones de distribución de proteínas nucleares descritos (Stein *et al*, 2003 b), los focos de replicación observables durante el S-temprano presentan el patrón punteado más parecido al de las proteínas AcMFP1 detectado mediante los sueros 288 y 91. Esto nos llevó a estudiar si las proteínas AcMFP1 co-localizaban con los complejos de replicación activos, incubando núcleos del meristemo radicular en los que se había incorporado previamente BrdU (análogo de la Timidina), simultáneamente con el suero 288 y un anticuerpo anti-BrdU.

Al comienzo de estos experimentos el conocimiento de la distribución topológica de los focos de replicación en plantas era muy rudimentario (Sparvoli *et al*, 1994), y se desconocía en cebolla. Por ello y previamente al estudio de co-localización con los sueros anti-MFP1, caracterizamos mediante IF los sitios de replicación en células sincronizadas del meristemo radicular de esta especie, para establecer su evolución espacio-temporal a lo largo de la fase S.





**Figura 40. Secuencia espacio-temporal de la replicación de células proliferantes de la raíz de cebolla.**

**(a)** Esquema del diseño experimental utilizado para la sincronización con hidroxurea (HU), y de los puntos de la fase S estudiados. La longitud de las barras es proporcional a la duración de los compartimentos del ciclo. Las horas indicadas en la parte inferior son relativas a la hora cero (0h), momento en que se libera a las raíces del bloqueo con HU. En cada una de las tomas se suministró  $10^{-4}$ M BrdU durante los 45 min previos a la misma, para marcar los focos de replicación. **(b)** Los histogramas del citómetro de flujo muestran la progresión de la ola de células sincronizadas (flecha roja) a lo largo de la fase. 2C y 4C son los contenidos de ADN en G1 y G2, respectivamente. **(c)** Frecuencias de los patrones de marcado I, II, III, IV y V de los focos de replicación observables mediante inmunodetección con un anticuerpo anti-BrdU durante la fase S a intervalos de una hora (ver Fig. 41). Los porcentajes a la derecha de los histogramas indican la proporción de células proliferantes (BrdU+) en cada una de las horas.

#### 4.2.1. Marcado con anti-5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU)

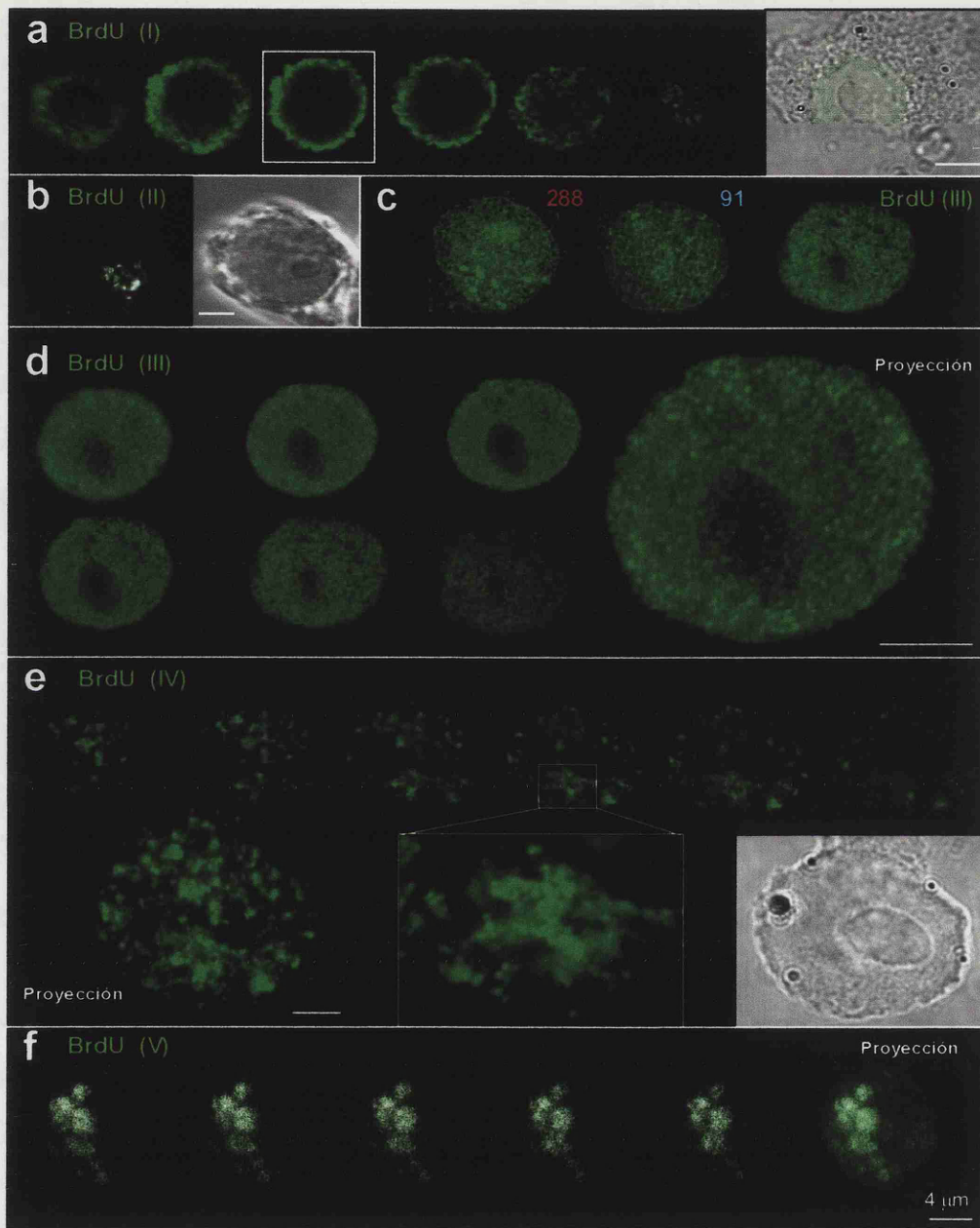
Se estudió la secuencia espacio-temporal de los sitios de replicación en células meristemáticas sincronizadas con HU, a las que se dieron pulsos de BrdU después de liberarlas del bloqueo. Posteriormente se detectaron los focos de síntesis de ADN mediante IF con un anticuerpo anti-BrdU (Fig 40 a).

El avance de las células una vez liberadas del bloqueo a través del periodo S se controló mediante citometría de flujo (Fig 40 b). Esta tecnología nos permitió seguir el paso de la ola de células sincronizadas a través de los distintos periodos del S y establecer una secuencia temporal de los patrones de replicación detectados mediante IF. Se detectaron cinco modelos de distribución para los focos de replicación (I, II, III, IV, V), cada uno de ellos característico de un período concreto de la fase S del ciclo celular (Samaniego *et al*, 2002).

En el periodo S-temprano se encienden numerosos focos de replicación de pequeño tamaño ( $\phi$  100-400 nm), distribuidos principalmente por la periferia nuclear y/o en uno de los polos nucleares (*patrón I*) (Fig 41 a). En el S-temprano también se observó un patrón en el que los focos se concentraban exclusivamente en el nucleolo (*patrón II*), no detectándose replicación simultánea en el resto del núcleo en esos momentos (Fig 41 b). Ambos patrones se detectaron durante las dos primeras horas de la fase S, que dura cinco horas (Fig 40 b, c).

En este periodo se observa también una alta proporción de núcleos que presentan el *patrón III*, con numerosos puntos fluorescentes correspondientes a los focos de replicación ( $\phi$  100-400 nm), distribuidos homogéneamente por el núcleo, excluyendo el nucleolo (Fig 41 c, d). El patrón III es el más abundante durante la primera mitad de la fase S (Fig 40 b, c).





**Figura 41. Organización topológica de los sitios de replicación a lo largo del periodo S.**

Imágenes de núcleos proliferantes del meristemo radicular de la raíz de cebolla procedentes de las tomas efectuadas en distintos momentos de la fase S, como se expresa en la figura anterior, incubados con el anticuerpo anti-BrdU y observados mediante IF. Se detectaron cinco patrones de marcado distintos, y característicos para cada periodo de la fase S. **(a)** Patrón I: los focos de replicación de pequeño tamaño se distribuyen principalmente por la periferia nuclear y/o en uno de los polos nucleares. **(b)** Patrón II: los sitios se localizan en la periferia y/o el interior del nucleolo. **(c)** Imágenes que muestran el parecido topológico entre el patrón III de distribución de los sitios de replicación y el patrón *punteado* de distribución de las proteínas AcMFP1 detectado con los sueros 288 y 91. En los tres casos se muestra un corte sencillo correspondiente a la parte central del núcleo. **(d)** Patrón III: los numerosos sitios de replicación se distribuyen homogéneamente por el interior del núcleo, excluyendo el nucleolo. **(e)** Patrón IV: los sitios de replicación son mayores que los de (a-d), y están formados por agrupaciones de focos de menor tamaño que originan focos heterogéneos distribuidos por el núcleo (ver detalle). **(f)** Patrón V: focos de gran tamaño que se acumulan preferentemente en el polo telomérico del núcleo. Todas las imágenes se tomaron mediante Microscopía Confocal de fluorescencia, mostrándose las correspondientes proyecciones de cortes virtuales sucesivos en (b,d,e,f), y las imágenes de contraste interferencial en (a,b,e). Barras=4μm.



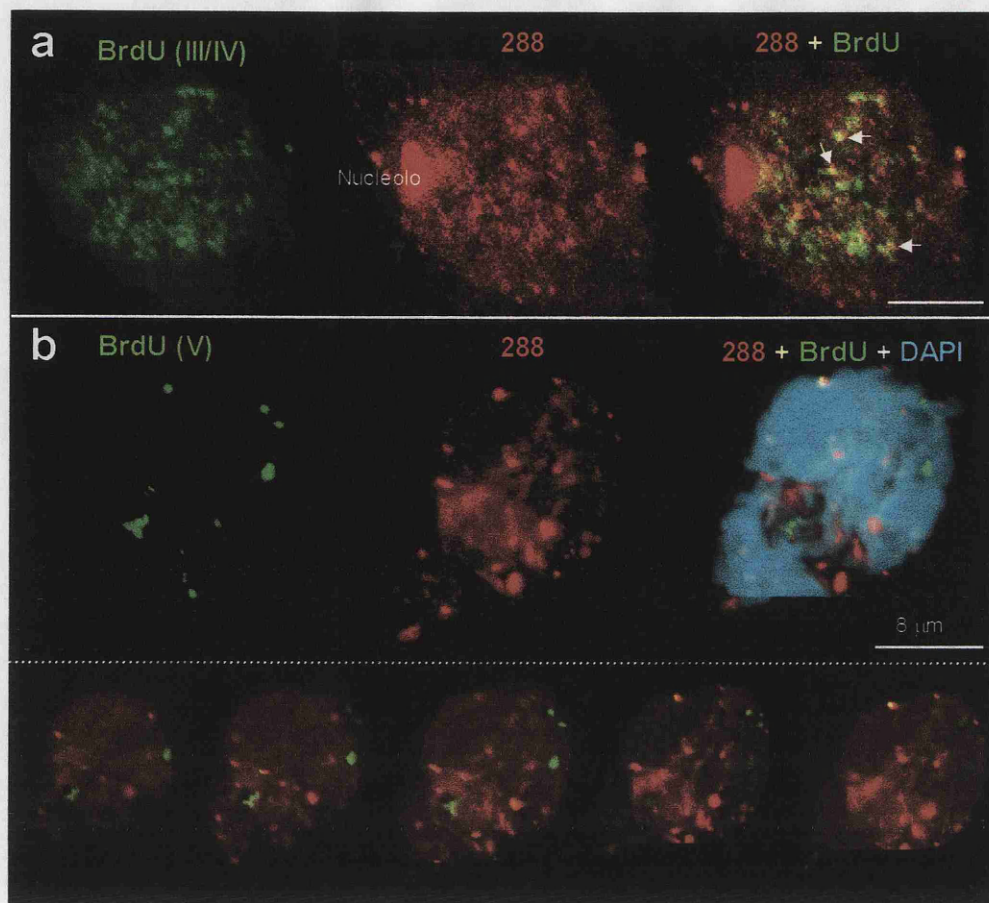
En el S-tardío el más abundante era el patrón IV (Fig 40 b, c), constituido por focos de replicación mayores que los del S-temprano, formados a su vez por agrupaciones de focos de menor tamaño que originan focos heterogéneos distribuidas por el núcleo (Fig 41 e). El patrón V (Fig 40 b, c) estaba formado por focos de gran tamaño que se acumulaban preferentemente en el polo telomérico del núcleo (Fig 41 f), como se vio en células binucleadas (Samaniego *et al*, 2002). En este periodo se observan también núcleos con los patrones I, II y III correspondientes a las células que inician una nueva ronda de replicación (Fig 40 c).

#### **4.2.2. Estudio de co-localización entre BrdU y AcMFP1**

La distribución del marcado de AcMFP1 no coincidía de forma generalizada con la de los focos de replicación. No obstante, se observó cierto grado de co-localización en una pequeña proporción de estos últimos, donde se acumula la proteína de 78 KDa (Fig 42 a). Este resultado era esperable, ya que se había observado ultraestructuralmente que la proteína se acumula en estructuras laxas situadas en la periferia de las masas densas de cromatina (Fig 30 b, c), localización coincidente con la de los focos de replicación.

Los cuerpos nucleares enriquecidos en la proteína de 90 KDa no presentaron co-localización significativa con los sitios de replicación típicos del S-tardío (patrón V) (Fig 42 b).

Estos resultados sugieren que AcMFP1 no es un componente de los focos de replicación, pero muestra una asociación transitoria con los mismos cuyo significado desconocemos por el momento.



**Figura 42. Relación topológica de las proteínas AcMFP1 con los sitios de replicación en células proliferantes de la raíz de cebolla.**

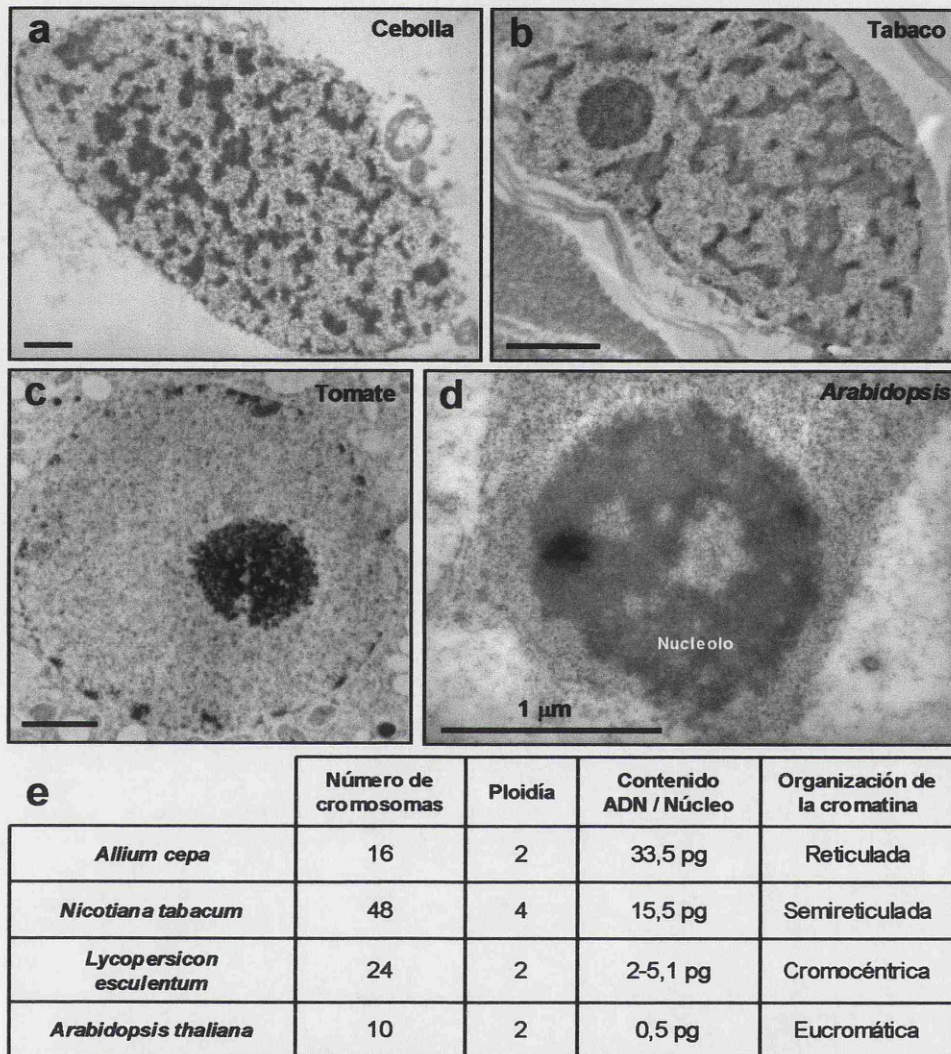
(a) Imagen correspondiente a la proyección de seis cortes virtuales sucesivos de un núcleo con un patrón de replicación III, característico de la mitad de la fase S, al que se le ha suministrado un pulso con BrdU y posteriormente incubado con anti-BrdU y 288. La distribución de MFP1 no co-localiza con el ADN recién sintetizado, ni coincide de forma generalizada con los focos de replicación, aunque se detecta co-localización en una pequeña proporción de focos con (flechas). (b) Imagen correspondiente a la proyección de cortes virtuales sucesivos de un núcleo incubado como el anterior, con un patrón V de replicación. Los cuerpos de MFP1 no presentan co-localización con los focos de replicación grandes del S-tardío, a pesar de la similitud de tamaños. Se muestra también una serie de cinco cortes virtuales del mismo núcleo. Barras: 8 μm.

## 5. DISTRIBUCIÓN DE MFP1 EN DISTINTAS ESPECIES VEGETALES

Las características genéticas y la organización de los núcleos de las especies vegetales en las que se ha caracterizado MFP1 son muy distintas. Varían principalmente en la cantidad de ADN, el número de cromosomas y la organización cromatínica (Fig 43 e). *A. cepa* (33,5 pg ADN) (Fig 43 a, e) y *N. tabacum* (15,5 pg ADN) en menor proporción (Fig 43 b, e), poseen gran cantidad



de heterocromatina distribuida por todo el núcleo, que adopta una organización topológica reticulada y semireticulada, respectivamente.



**Figura 43. Características ultraestructurales de los núcleos de cebolla, tabaco, tomate y *Arabidopsis*.**

Imágenes de cortes ultrafinos observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de núcleos de cebolla (*A. cepa*) (a), tabaco (*N. tabacum*) (b), tomate (*L. esculentum*) (c) y *Arabidopsis thaliana* (d). Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. (e) Tabla resumen de algunas características nucleares para cada especie. Barras: 1 µm.

En *L. esculentum* (~3 pg ADN) (Fig 43 c, e), la escasa heterocromatina existente se distribuye principalmente en cromocentros asociados a la envoltura nuclear, mientras que apenas se observan masas densas de heterocromatina en

el pequeño núcleo de *A. thaliana* (0,5 pg ADN) (Fig 43 d, e). Así, los núcleos de cebolla organizan 33,5 pg de ADN (contenido 2C) de los que el 95% son secuencias repetidas heterocromatínicas (Pitch y Schubert, 1998; Barnes *et al*, 1985), mientras que en el núcleo de *Arabidopsis* se organizan sólo 0,5 pg de ADN, 70 veces menos (Marie y Brown, 1993).

Estas diferencias en contenido y organización de su ADN, van acompañadas también de diferencias en la organización de otros subdominios nucleares, como los cuerpos de Cajal (Echeverría *et al*, 2004; Cui y Moreno Díaz de la Espina, 2002), y probablemente influyan en la distribución de MFP1, una proteína que se asocia al ADN.

Por este motivo decidimos analizar la distribución subcelular de MFP1 en las tres especies vegetales donde se ha secuenciado la proteína, usando la misma metodología de IF utilizada en cebolla.

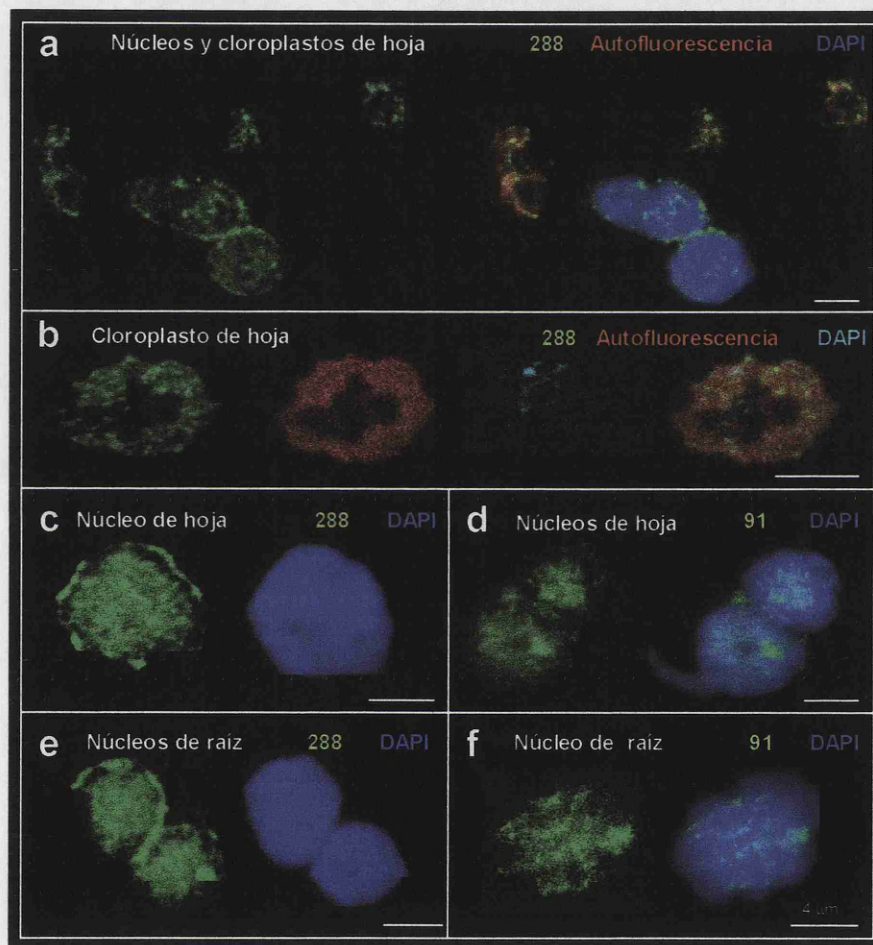
### **5.1. MFP1 en tomate**

Se estudió la distribución de LeMFP1 en raíz y hoja de tomate mediante IF utilizando ambos sueros 288 y 91. Debido a la similitud de tamaño, durante el procedimiento de preparación de núcleos aislados co-purifican con ellos cloroplastos y otros orgánulos celulares de hoja de tomate, que se diferencian en IF por su autofluorescencia roja en el caso de cloroplastos y la tinción con DAPI del ADN de los nucleoides, distinta de la detectada en los núcleos.

Núcleos y cloroplastos mostraron distribuciones características para las proteínas en cada orgánulo con el suero 288 (Fig 44 a, b, c, d). En los núcleos, la proteína se distribuía en focos de pequeño tamaño y de forma difusa por el retículo del nucleoplasma, mostrando un intenso marcado periférico sobre la envoltura nuclear (Fig 44 c). Con el suero 91 el marcado intranuclear era similar, pero no se detectaba la intensa señal de la envoltura nuclear (Fig 44 d).



Los cloroplastos, que se destacaban del resto de las estructuras celulares co-purificadas por su autofluorescencia roja debida a la clorofila y otros pigmentos, así como por la presencia del ADN cloroplástico de los nucleoides teñido con DAPI, presentaron en la inmensa mayoría de los cloroplastos marcado con el suero 288.



**Figura 44. Distribución de LeMFP1 en núcleos y cloroplastos de tomate.**

Las imágenes corresponden a cortes centrales de núcleos y/o cloroplastos obtenidas mediante microscopía confocal. Los cloroplastos muestran autofluorescencia (rojo), los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul) y las proteínas MFP1 en verde. **(a)** Fracción de núcleos y cloroplastos co-purificados de hoja de tomate incubados con el suero 288. Se observa un marcado con el suero característico para cada orgánulo. **(b)** Cloroplasto de hoja incubado con el suero 288. En este caso el ADN del nucleóide aparece teñido con DAPI. Núcleos de hoja **(c)** y raíz **(e)** incubados con 288. Se observa claramente el marcado perinuclear con el suero 288, típico de esta especie. Núcleos de hoja **(d)** y raíz **(f)** incubados con el suero 91, el marcado perinuclear no es evidente. Barras: 4 μm.



Los focos de marcado se observaron dispersos por el cloroplasto, ocupando algunas veces posiciones adyacentes a la de los nucleoides teñidos con DAPI, sin detectarse verdadera co-localización entre ambos subdominios. No obstante, el marcado difuso de LeMFP1 y el correspondiente al ADN cloroplástico descondensado, se superponían por distintas áreas del cloroplasto (Fig 44 b). En los núcleos de raíz la distribución del marcado observado con ambos sueros fue similar a la descrita para los núcleos de hoja (Fig 44 e, f).

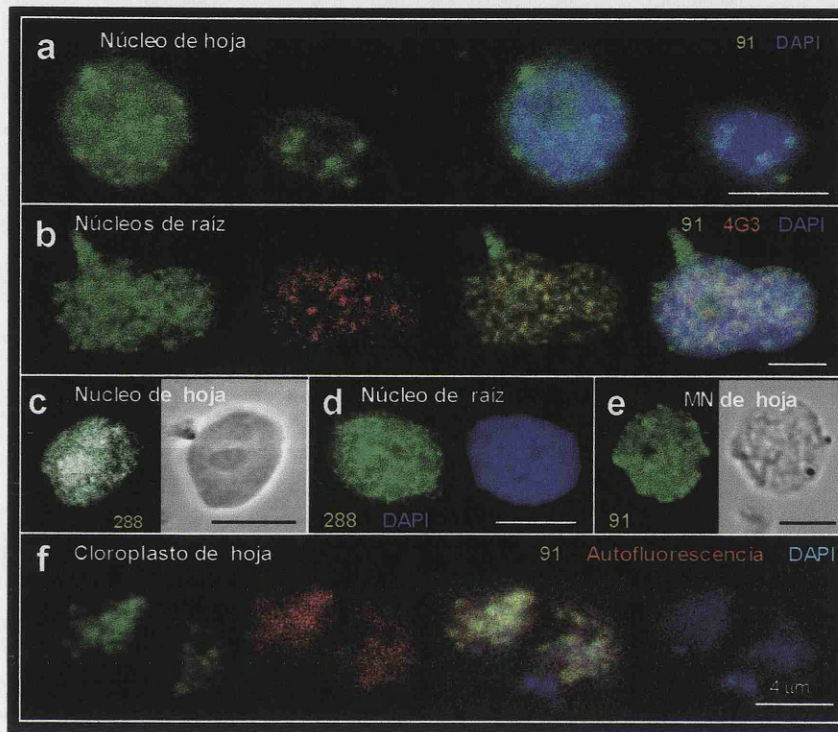
## **5.2. AtMFP1 en *Arabidopsis* y su *knockout***

Se estudió mediante IF la distribución de AtMFP1 en núcleos aislados de hojas y raíces enteras de plantas silvestres de *A. thaliana* y del *knockout* para *AtMFP1*. El pequeño tamaño del núcleo de *Arabidopsis*, similar al de un nucleolo de cebolla, hizo difícil su análisis mediante microscopía de fluorescencia.

Mediante el suero 91, producido contra la proteína de esta especie, MFP1 mostró un patrón de marcado mayoritariamente punteado, incluyendo algunos focos de mayor tamaño y marcado nucleolar adicional en el 10% de los núcleos (Fig 45 a). Se realizaron incubaciones simultáneas con el suero 91 y el anticuerpo 4G3, específico contra la proteína nuclear U2B'' del espliceosoma, que demostraron que tal y como sucede en cebolla (Fig 39) la co-localización entre ambas proteínas no era significativa (Fig 45 b). Los marcados detectados con el suero 288 en esta especie fueron similares a los detectados con el suero 91, y nunca se observó el marcado perinuclear típico de los núcleos de tomate (Fig 45 c, d).

Para comprobar si AtMFP1 estaba asociada a la matriz nuclear, se utilizaron fracciones de MN preparadas según el protocolo utilizado en cebolla a partir de núcleos aislados de hojas de *Arabidopsis*. AtMFP1 mostró un marcado difuso con el suero 91 por el retículo de estas fracciones (Fig 45 e), demostrando que la

proteína permanece fuertemente unida al nucleoesqueleto tras una extracción con DNasa y alta fuerza iónica.



**Figura 45. Distribución de AtMFP1 en núcleos y cloroplastos de *Arabidopsis*.**

Imágenes de cortes centrales de núcleos y cloroplastos tomadas mediante microscopía confocal **(a)** Núcleos de hoja incubados con el suero 91. MFP1 sigue un patrón de distribución difuso por el retículo nuclear, acumulándose además en algunos focos de gran tamaño. **(b)** Núcleos de raíz marcados simultáneamente con el suero 91 (verde) y 4G3 (rojo), que detecta la proteína nuclear U2B'' de *splicing*. No se observa co-localización significativa. **(c y d)** Núcleos de hoja (c) y raíz (d) incubados con el suero 288. Se observa un patrón de distribución de MFP1 similar al detectado con el suero 91. En el núcleo de hoja un marcado nucleolar adicional. Se muestran las correspondientes imágenes de contraste de fase y tinción con DAPI. **(e)** Matriz nuclear de hoja incubada con el suero 91, donde MFP1 muestra una distribución similar a la detectada en los núcleos aislados. Se muestra la correspondiente imagen de contraste interferencial, ya que al haberse extraído el ADN la tinción con DAPI resulta negativa. **(f)** Cloroplasto de hoja incubado con el suero 91. El ADN del nucleóide aparece teñido con DAPI (azul), y la autofluorescencia emitida por los pigmentos del cloroplasto se recoge en el canal rojo de emisión. El marcado de MFP1 no co-localiza con el ADN condensado del nucleóide, aunque se distribuye por zonas del cloroplasto donde existe ADN descondensado. Barras: 4 µm.

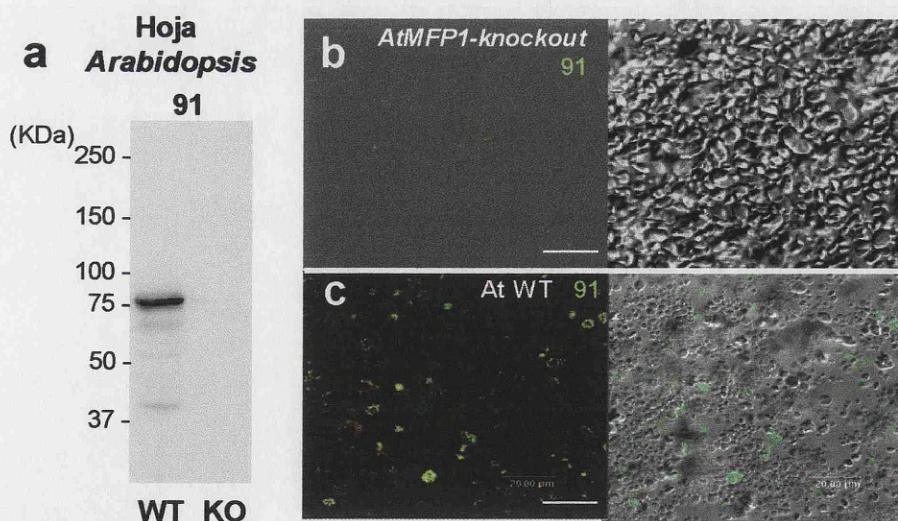
El marcado con el suero 91 en cloroplastos de hoja de *Arabidopsis* (co-purificados durante el aislamiento de núcleos) fue similar al descrito mediante el suero 288 en cloroplastos de tomate, donde los focos de marcado raramente coincidían con la posición ocupada por el nucleóide teñido con DAPI (Fig 45 f). AtMFP1 se distribuía de forma difusa por el retículo del cloroplasto coincidiendo



en numerosas ocasiones con el ADN descondensado, por lo que no es descartable una interacción entre la proteína y el ADN cloroplástico, aunque ésta no sucedería en el nucleóide.

Se comprobó mediante inmunodetección en membrana que el suero 91 detectaba una banda de 80 KDa correspondiente a AtMFP1 en fracciones de núcleos aislados de hojas de la estirpe silvestre de *Arabidopsis*. Esta banda prácticamente desaparecía en las fracciones correspondientes a la planta *knockout* para AtMFP1 (Fig 46 a). De igual forma aparecían marcados mediante IF con el suero 91 el 95% de ambos núcleos y cloroplastos en la planta silvestre (Fig 46 c), mientras que en la planta *knockout* el marcado sólo se detectaba en un 5% de ambas estructuras celulares (Fig 46 b).

Este resultado, además del interés para la caracterización del *knockout*, demuestra la efectividad del método de IF en suspensión, validando los marcados descritos hasta el momento para AcMFP1.

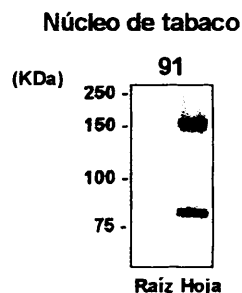


**Fig 46. Detección de AtMFP1 en *Arabidopsis* y el *knockout* para MFP1.**

(a) Inmunodetección en membrana de AtMFP1 en fracciones nucleares de hoja de *Arabidopsis* de plantas silvestres (WT) y del *knockout* para AtMFP1 (KO). (b y c) Imágenes a bajo aumento de preparaciones incubadas con el suero 91 de núcleos y cloroplastos co-purificados de las plantas *knockout* (b) y silvestre (c). Se muestran las imágenes superpuestas de IF y contraste interferencial. No se detectó marcado en las preparaciones de la planta *knockout* con ninguna de las dos técnicas. Barras: 20 μm.

### 5.3. MFP1 en tabaco y en plantas transformadas con *AtMFP1*

Por último se estudió la presencia y distribución de NtMFP1 en tabaco, donde se ha descrito la existencia de dos genes *NtMFP1* de distinto tamaño (Gindullis y Meier, 1999), muy conservados entre sí y con *LeMFP1* (90%), y menos conservados con *AtMFP1* (45%) (Harder *et al*, 2000).

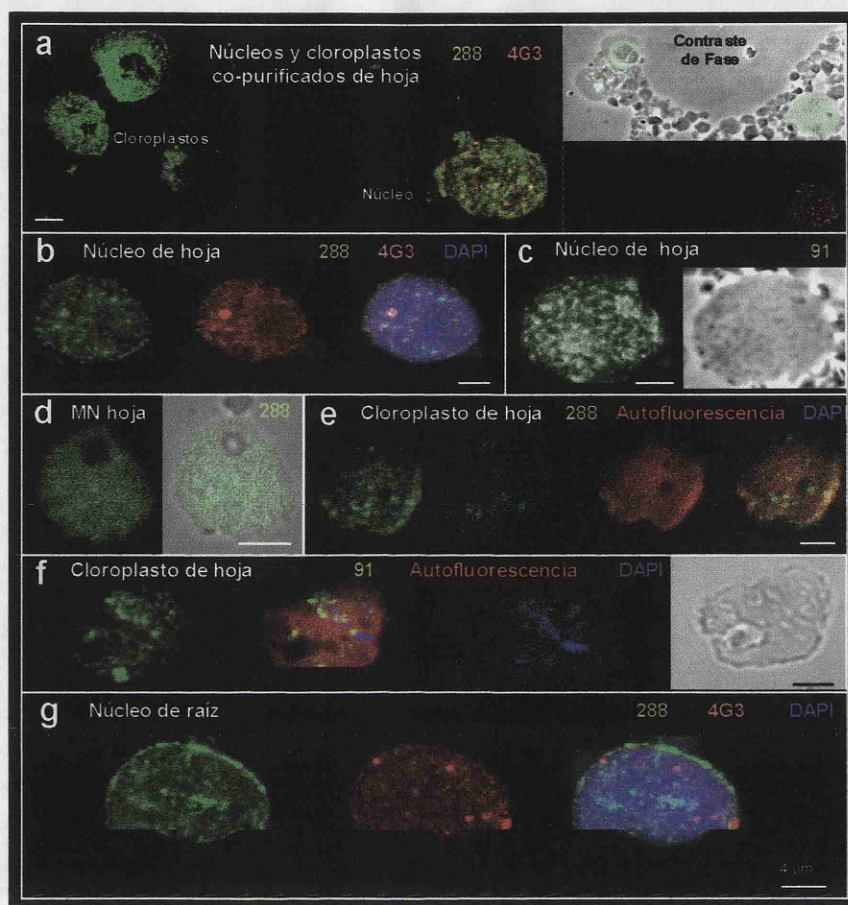


**Figura 47. Inmunodetección de NtMFP1 en fracciones nucleares de raíz y hoja de tabaco con el suero 91.**

El suero 91 no detecta las proteínas de tabaco en núcleos aislados de la raíz, ni mediante inmunodetección en membrana ni mediante IF (no mostrado). En núcleos aislados de hoja detecta una banda de 80 KDa correspondiente a NtMFP1, y una banda intensa de 160 KDa que corresponde probablemente a la forma polimerizada de la proteína, como sucede en cebolla y tomate.

Mediante el suero 91 se detectaron dos bandas en fracciones de núcleos aislados de hoja de tabaco. Una banda de 80 KDa correspondiente a NtMFP1 (Fig 47), y una banda adicional de 160 KDa correspondiente a la forma polimerizada no completamente desnaturalizada de NtMFP1, como sucede en cebolla (Fig 6) y probablemente en tomate, donde también se había detectado una banda similar con anterioridad (Harder *et al*, 2000), lo que sugiere que se trataría de un fenómeno habitual en MFP1, proteína capaz de formar estructuras superenrolladas en *coiled-coil*.





**Figura 48. Distribución topológica de NtMFP1 en núcleos y cloroplastos de tabaco.**

Las imágenes de fluorescencia confocal corresponden a cortes centrales de núcleos y/o cloroplastos. **(a)** Núcleos y cloroplastos de hoja co-purificados y marcados simultáneamente con el suero 288 y el marcador de *splicing* 4G3, que detecta la proteína nuclear U2B'' del espliceosoma. En la correspondiente imagen de contraste de fase se observan a menor aumento otros numerosos orgánulos vegetales claramente distintos, que también co-purifican con los núcleos y los cloroplastos pero no contienen ninguna de las dos proteínas. **(b)** Núcleo de hoja teñido con DAPI e incubado simultáneamente con 288 y 4G3. En la superposición de las imágenes es evidente que las proteínas no co-localizan y se observa claramente un cuerpo de Cajal grande distinto de los cuerpos de MFP1. El marcado del nucleolo es muy bajo. **(c)** Núcleo de hoja incubado con el suero 91 y la correspondiente imagen de contraste interferencial. **(d)** Matriz nuclear de células de hoja incubada con el suero 288, mostrando una distribución asociada a la matriz interna. Se muestra la imagen de contraste interferencial correspondiente superpuesta a la de fluorescencia. **(e y f)** Cloroplastos de hoja incubados con los sueros 288 (e) y 91 (f). En ambos casos la autofluorescencia de los pigmentos del cloroplasto se observa en rojo, y el ADN del cloroplasto aparece teñido con DAPI. El marcado de la proteína es difuso-punteado y no co-localiza con el ADN condensado del nucleóide, aunque sí se distribuye por zonas en las que también se detecta el ADN descondensado. **(g)** Núcleo de raíz incubado simultáneamente con 288 y 4G3. Se observa una distribución periférica típica de raíz que es análoga a la observada en tomate (Fig 44). Queda patente así mismo que MFP1 no co-localiza con las proteínas de *splicing*, aunque ambos se distribuyen en el dominio intercromatínico. El suero 91 no detecta NtMFP1 en los núcleos de la raíz (no mostrado), véase la figura anterior. Barras: 4 μm.

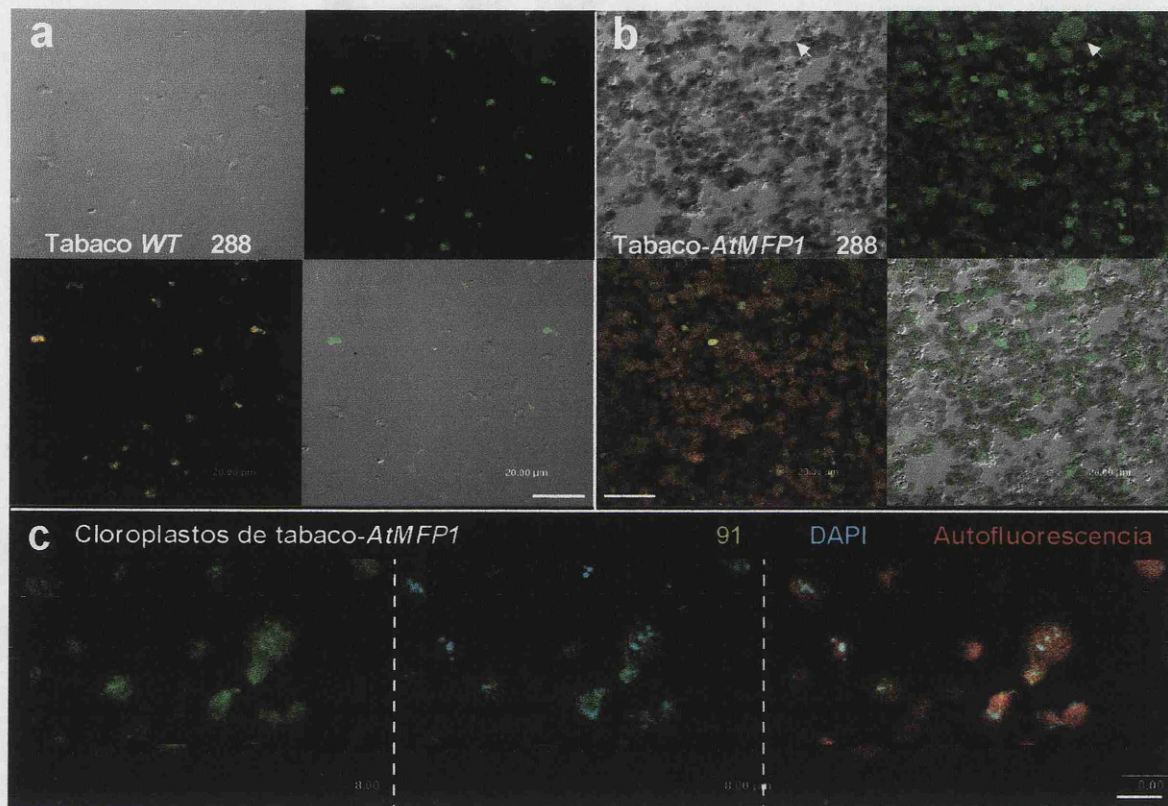


Se estudió mediante IF la distribución de NtMFP1 en núcleos y cloroplastos co-purificados de hojas de tabaco. La señal nuclear detectada mediante el suero 288 se acumulaba en numerosos focos fluorescentes que no coincidían significativamente con los cuerpos de Cajal, detectados simultáneamente con el anticuerpo 4G3; y en el nucleoplasma de forma difusa (Fig 48 a, b), asociada a la envoltura nuclear y sólo en el 30% de los nucleolos.

Mediante el suero 91 (anti-AtMFP1) se detectaron marcados nucleares similares a los descritos con el suero 288 (anti-LeMFP1), pese a que AtMFP1 y NtMFP1 no poseen secuencias muy conservadas (Fig 48 c). Con este suero se demostró que NtMFP1 permanecía unida a la MN de hojas de tabaco, presentando un marcado de fluorescencia (Fig 48 d) parecido a los descritos en *Arabidopsis* y cebolla.

En cloroplastos, como ocurría en tomate y *Arabidopsis*, la proteína presentaba un patrón difuso-punteado, en el que los focos raramente coincidían con los nucleoides teñidos con DAPI (Fig 48 e, f; 49 c).

No se observaron variaciones cualitativas en la distribución de MFP1 en núcleos y cloroplastos de hojas de tabaco transformadas con el gen AtMFP1, que es similar a la descrita anteriormente en plantas silvestres para ambos sueros. Se detectó sin embargo un aumento importante (6x) en el número de cloroplastos existentes en cada célula de hoja, como se puede observar en muestras correspondientes a plantas silvestres y transformadas con una misma densidad nuclear (Fig 49 a, b, c).

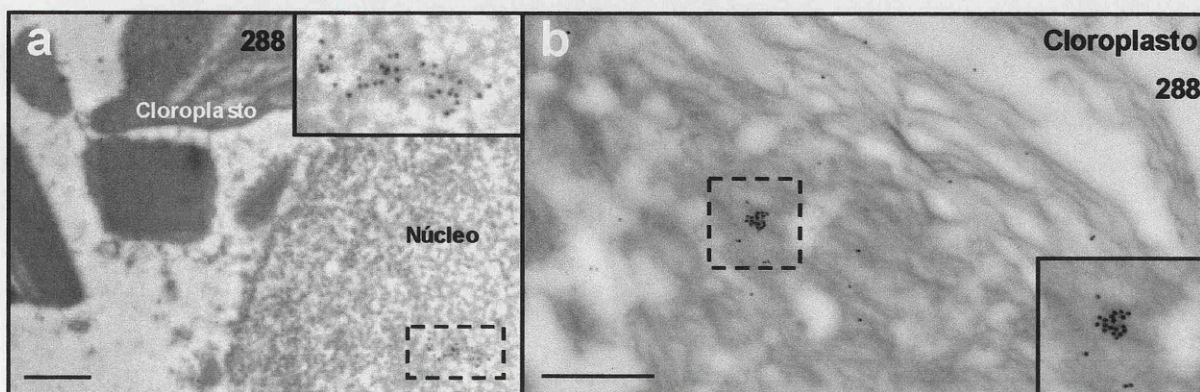


**Figura 49. Distribución topológica de MFP1 en hojas de plantas de tabaco silvestres y transformadas con *AtMFP1*.**

(a y b) Imágenes a bajo aumento de fracciones de núcleos (flecha) y cloroplastos co-purificados de hojas de plantas silvestres de tabaco (a) y transformadas con *AtMFP1* (b) incubadas con el suero 288. Se muestran las imágenes correspondientes de contraste interferencial, así como las superposiciones de ambas. La distribución de MFP1 es similar a la descrita en la figura anterior. Barras: 20  $\mu\text{m}$ . (c) Cloroplastos de plantas transformadas con *AtMFP1* incubados con el suero 91 a mayor aumento. La autofluorescencia de los pigmentos de los cloroplastos en rojo, su ADN teñido con DAPI en azul y MFP1 en verde. La distribución de MFP1 no varía en el núcleo y los cloroplastos de las plantas silvestres y transformadas, aunque se observa un incremento importante (6x) del número de cloroplastos en las plantas transformadas, como se comprobó mediante recuentos en muestras que tenían una misma densidad nuclear. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

Por último, se incubaron muestras de protoplastos de tabaco con el suero 288 y se visualizó el marcado con anticuerpos conjugados con oro para ME. El marcado nuclear observado fue disperso con acumulaciones de partículas de oro ocasionales (Fig 50 a). Sobre los cloroplastos se observaron tanto acumulaciones de partículas de oro como partículas aisladas localizadas sobre las membranas de los tilacoides (Fig 50 b), lo que concuerda con el marcado detectado mediante IF que revela un marcado difuso con focos de fluorescencia ocasionales (Figs 48 e, f; 49 c).





**Figura 50. Distribución de NtMFP1 a alta resolución en protoplastos de hoja de tabaco.**

Inmunomarcado con oro para ME. **(a)** Imagen de un corte ultrafino incubado con el suero 288, en la que se observan una agrupación de partículas de oro sobre el núcleo, que se muestra ampliada en el recuadro. **(b)** Imagen de un cloroplasto en un corte similar. Se observan un grupo denso de partículas de oro, y numerosas partículas individuales distribuidas por las membranas de los tilacoides. Barras: 500 nm.

DISCUSIÓN

## 1. IDENTIFICACIÓN DE DOS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS DE MFP1 EN CEBOLLA

### 1.1. Especificidad de los sueros 288 y 91 e identificación de las proteínas AcMFP1

Los sueros 288 y 91 reconocen las proteínas MFP1 heterólogas del resto de las especies vegetales en las que se han probado hasta el momento, a pesar de las diferencias de secuencia entre ellas (Jeong *et al*, 2003; Harder *et al*, 2000), quedando la especificidad de las reacciones garantizada por la ausencia de reacción con los sueros preinmunes correspondientes. La especificidad de las técnicas de inmunodetección *in situ* en *A. cepa* está también garantizada por la ausencia de reacción con los sueros preinmunes, y con los sueros anti-MFP1 en muestras de plantas de *A. thaliana knockout* para MFP1, así como por la alta concordancia entre los patrones de distribución topológica detectados con los sueros homólogos y heterólogos, especialmente en *Arabidopsis* y tomate, a excepción del marcado perinuclear de este último que sólo se detecta con el suero homólogo.

Estos mismos sueros detectan en *A. cepa* una familia o grupo de proteínas antigénicamente relacionadas con MFP1, que migran a 210, 160, 90, 63, 55 KDa y en un doblete de 78 KDa. Mediante técnicas de inmunoprecipitación seguida de inmunodetección en membrana, que proporciona un reconocimiento de las proteínas tanto en su conformación nativa como desnaturalizada con SDS, se han identificado entre ellas dos proteínas heterólogas de MFP1, correspondientes a las proteínas de 90 y 78 KDa. En el caso de ésta última el reconocimiento es doble, al ser inmunoprecipitada por uno de los sueros e inmunodetectada por el otro.

Los extractos celulares analizados de *A. cepa* contienen, como ya se ha comentado, una familia de proteínas inmunoreactivas con los sueros anti-MFP1. Una de ellas, la banda de 160 KDa, corresponde a una forma de polimerización de la proteína de 78 KDa, como queda demostrado por su completa solubilización con SDS y urea, y con altas concentraciones de SDS. Al tratarse de



un heterólogo potencial de MFP1 en cebolla, es probable que la proteína de 78 KDa posea el extenso dominio en coiled-coil típico de estas proteínas (Harder et al, 2000), capaz de formar estructuras poliméricas superenrolladas difíciles de desnaturalizar, habiendo sido detectadas bandas similares de 160 KDa en tabaco y anteriormente en tomate (Meier et al, 1996).

A falta de las secuencias que lo confirmen, las proteínas de 90 y 78 KDa serían los heterólogos principales de MFP1 en cebolla, ya que además de compartir dominios antigénicos con ellas, poseen otras características de las MFP1s de otras especies. AcMFP1-78 KDa posee una Mr similar a la descrita para MFP1 de tomate (Meier et al, 1996), tabaco, soja, arroz, maíz, trigo (Harder et al, 2000) y *Arabidopsis* (Jeong et al, 2003), y como en esta última migra formando un doblete de aproximadamente 80 KDa (Jeong et al, 2004); posee un valor de pI ligeramente ácido similar al de LeMFP1 (Meier et al, 1996) y NtMFP1 (Jeong et al, 2004); forma polímeros que migran como una banda de 160 KDa, detectada también en tabaco y tomate (Meier et al, 1996); y presenta una doble localización subcelular en núcleos y cloroplastos, como en tabaco y *Arabidopsis* (Jeong et al, 2003 y 2004).

Por su parte, AcMFP1-90 KDa es un componente de la matriz nuclear, independientemente de la fuerza iónica del método de extracción utilizado, como las proteínas NtMFP1 y AtMFP1; y presenta múltiples isoformas de fosforilación, como se ha descrito en la proteína de la fracción plastídica de la proteína de tabaco (Jeong et al, 2004). Aunque al no estar secuenciada no se conoce si contiene secuencias consenso para fosforilación por CK2, hemos demostrado que es fosforilable por esta enzima, al igual que las proteínas de tomate (Meier et al, 1996) y *Arabidopsis* (Jeong et al, 2004).

Ambas proteínas de cebolla presentan características típicas de MFP1, por lo que serían isoformas potenciales de AcMFP1 producidas por un uso variable de sitios de iniciación de traducción, por modificaciones postraduccionales o mediante *splicing* alternativo de un mismo gen; aunque también podrían ser proteínas homólogas codificadas por dos genes diferentes, como en el caso de

tabaco donde se han detectado dos genes *NtMFP1*, aunque hasta ahora sólo se haya caracterizado una proteína (Harder *et al.*, 2000). En estos momentos carecemos de información que permita descartar cualquiera de estas opciones, ya que se desconoce si el gen *MFP1* posee intrones, al haberse clonado en todos los casos a partir de genotecas de cDNA; o si existen uno o más genes *AcMFP1*, al haber sido infructuoso el rastreo de la genoteca de cDNA de cebolla.

Las proteínas antigénicamente relacionadas con *MFP1*, incluidas las isoformas principales de 78 y 90 KDa, son detectadas con distinta afinidad por los sueros anti-*MFP1*, y presentan diferentes patrones de expresión y distribución nuclear. La proteína citoplasmática de 55 KDa sólo es reconocida por el suero 288, mientras que las del doblete de 63 KDa son reconocidas exclusivamente por el suero 91. Estas últimas no son constitutivas y se inducen en células diferenciadas de raíz cuando disminuyen los niveles de la proteína de 78 KDa. Además de los posibles orígenes de las isoformas de *AcMFP1* ya expuestos, estas dos proteínas podrían formarse también por proteólisis de las proteínas principales de mayor peso molecular.

Respecto a la proteína de 210 KDa, su reacción con los sueros es muy débil y depende de la concentración de los mismos. Su *Mr* es similar a la de uno de los homólogos de *AcNuMA*, y presenta características similares de solubilidad (Yu y Moreno Díaz de la Espina, 1999), por lo que es posible que corresponda a una reacción cruzada de los sueros con *AcNuMA*, ya que *MFP1* y *NuMA* tienen dominios *coiled-coil* parcialmente conservados y los sueros están desarrollados precisamente contra este dominio de *MFP1* (Meier *et al.*, 1996).

Los sueros anti-*MFP1* detectan ocasionalmente algunas bandas nucleares más, de intensidad variable y en el rango de 65-70 KDa, tanto en cebolla como en tomate y tabaco (Gindullis y Meier, 1999; Meier *et al.*, 1996). Bandas del mismo rango de *Mr* también se detectan en cebolla y otras plantas (Blumenthal *et al.*, 2004) mediante IFA, anticuerpo que reconoce un epítipo del extremo carboxílico del dominio *coiled-coil* conservado en todos los de Filamentos Intermedios que es esencial para su dimerización (Yu y Moreno Díaz de la Espina,

1999), sugiriendo que estas bandas podrían ser reacciones cruzadas con proteínas, de este tipo, abundantes en la franja de 60-70 KDa de fracciones nucleares de plantas (Blumenthal et al, 2004; Frederick et al, 1992), y más concretamente podría ser las proteínas antigénicamente relacionadas con las laminas, que migran en cebolla en el rango de 65-70 KDa (Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993) y tienen una cierta conservación de secuencia con MFP1 (Meier et al, 1996).

Recientemente, Blumenthal y colaboradores (2004) han demostrado en guisante que proteínas tipo *coiled-coil* de 65, 60 y 54 KDa reconstituyen filamentos de 6-12 nm *in vitro* y tienen una distribución nuclear uniforme. El análisis de secuencia de los péptidos de digestión de las proteínas de 65 y 60 KDa revela que tienen regiones de similitud con varias proteínas de *Arabidopsis*, entre ellas MFP1, y forman un grupo de proteínas nucleares ácidas con segmentos largos en *coiled-coil* denominadas NAC (Nuclear Acidic Coiled-coil proteins), que serían el tipo de proteínas del nucleoesqueleto que sustituirían a las laminas en plantas, aunque sus Mr son mayores.

Por tanto, los sueros anti-MFP1 reconocen dos proteínas homólogas principales de MFP1 en cebolla de 78 y 90 KDa; detectan varias isoformas potenciales específicas de diferenciación; y presentan una débil reacción cruzada con NuMA y las proteínas NAC.

## **1.2. Clonación de AcMFP1**

Se ha intentado construir una genoteca de cebolla en numerosas ocasiones, aunque sin mucho éxito. Una genoteca de *A. cepa* sería de gran utilidad ya que este sistema posee características nucleares muy interesantes. Destacan la elevada cantidad de ADN de su genoma diploide, constituido mayoritariamente por secuencias repetidas (95%), y la alta proporción de heterocromatina, que origina un extenso retículo nuclear de cromatina condensada; posee secuencias teloméricas distintas de las secuencias consenso

de *A. thaliana* conservadas en plantas; y un elevado número de copias de ADN (Pich y Schubert, 1998; Panzera *et al*, 1997; Barnes *et al*, 1985). Además, los bulbos de cebolla son un sistema muy favorable para el fraccionamiento celular y la obtención de matrices nucleares, y las células de raíz incorporan fácilmente drogas y otros metabolitos del medio de cultivo facilitando los estudios fisiológicos. La accesibilidad del meristemo radicular, donde se concentra hasta un 75% de células proliferantes, hace a esta especie particularmente favorable para estudios de ciclo celular (Samaniego *et al*, 2002; Pelayo *et al*, 2001). Sin embargo, la alta cantidad de ADN, particularmente de secuencias repetidas no codificantes, suponen una clara desventaja a la hora de construir una genoteca competente de cDNA de cebolla.

Desgraciadamente, no se consiguió clonar *AcMFP1* durante el rastreo de la genoteca de cDNA de cebolla utilizada. Este resultado negativo puede estar relacionado tanto con la calidad de la genoteca empleada, como con la conservación de las secuencias de los oligonucleótidos y las sondas utilizadas en los rastreos. De hecho, la secuencia de *AtMFP1*, poco conservada con la de *LeMFP1* y *NtMFP1*, no se consiguió detectar mediante el rastreo de una genoteca de *Arabidopsis* (Dra. Meier, comunicación personal), sino cuando se publicó la secuencia completa de este genoma. Sin embargo, las secuencias de *NtMFP1-1* y *NtMFP1-2* se obtuvieron con facilidad a partir de una genoteca de tabaco, debido a la alta conservación de secuencia de las sondas de *LeMFP1* utilizadas (Dra. Meier, comunicación personal).

No obstante, suponiendo que algún fragmento de *AcMFP1* hubiera sido clonado en la genoteca en una proporción aceptable, la baja conservación de las secuencias *MFP1* podría haber dificultado el diseño de cebadores efectivos durante el rastreo por PCR, pese a haberse utilizado el dominio más conservado de la proteína, que abarca los últimos 800 nucleótidos del extremo 3'-OH de *MFP1*. Incluso dentro de este dominio de la proteína fue imposible encontrar una secuencia conservada en todas las especies, por lo que se tuvieron que utilizar cebadores en los que el 10-30% de los nucleótidos no coincidían en todas ellas.

El intento de confirmar la identidad de las proteínas AcMFP1 mediante purificación a partir de fracciones nucleares inmunoprecipitadas o separadas en geles bidimensionales, y digestión con Tripsina para conseguir su mapa peptídico y/o secuenciación de los fragmentos obtenidos, fue imposible debido a la baja cantidad de proteína obtenida, por debajo del umbral de tinción con plata, que impidió su posterior purificación y análisis.

Pese a no haber conseguido secuenciar las proteínas AcMFP1, su gran semejanza con MFP1 indica que las proteínas de 78 y 90 KDa son probablemente los heterólogos principales de la proteína en *A. cepa*. Una característica compartida con MFP1 es su fosforilación. AcMFP1-90 KDa se fosforila por la misma kinasa que MFP1 de *Arabidopsis*, tabaco (Jeong et al, 2004) y tomate (Meier et al, 1996). No disponemos de resultados definitivos en el caso de AcMFP1-78 KDa, que migra como un doblete con valores de pI moderadamente distintos y se recoge en sobrenadantes distintos durante la extracción de matrices nucleares, sugiriendo la existencia de modificaciones postraduccionales. Éstas posibles modificaciones podrían ser diferentes de las descritas para AcMFP1-90 KDa, o implicar a otras kinasas y fosfatasa en el caso de que también se trate de fosforilación. La obtención de las secuencias de las dos proteínas AcMFP1 habría aportado información relevante en este sentido, ya que se conocen numerosas secuencias consenso dianas de modificaciones postraduccionales.

## **2. LA ASOCIACIÓN DE AcMFP1-90 KDa A LA MATRIZ NUCLEAR ESTÁ REGULADA POR FOSFORILACIÓN CON CASEÍNA KINASA CK2**

### **2.1. La CK2 regula la unión de AcMFP1-90 KDa a la MN**

Aproximadamente la tercera parte de las proteínas nucleares y citoplasmáticas está regulada mediante procesos de fosforilación-defosforilación en eucariotas, existiendo kinasas y fosfatasa específicas para cada uno de estos compartimentos celulares, y unas pocas que actúan en ambos (Bollen y Beullens, 2002). La fosforilación-defosforilación afecta a numerosos procesos, uno



ampliamente estudiado pero no completamente conocido es el ensamblaje y desensamblaje nuclear que sucede durante el ciclo celular, en el que se fosforilan principalmente proteínas de la envoltura nuclear, como las laminas y otras proteínas asociadas (Hachet *et al*, 2004; Takano *et al*, 2004; Otto *et al*, 2001; Dechat *et al*, 1998), y del nucleoesqueleto como NuMA (Saredi *et al*, 1997).

La mayor parte de las proteínas de la matriz nuclear están reguladas mediante fosforilación. Sus efectos son muy variados, afectando principalmente a la función de las proteínas y/o a su distribución intranuclear (Imai *et al*, 2004; Nicoll *et al*, 2003; Pilipuk *et al*, 2003). En el caso de AcMFP1-90 KDa la fosforilación modula la fuerza con la que se une la proteína a la matriz nuclear, sin afectar aparentemente a su distribución nuclear. Las formas hipo- e hiper-fosforiladas de AcMFP1-90 KDa están distribuidas de manera similar en el núcleo, ya que la extracción de las formas hiper-fosforiladas con NaCl no induce variaciones significativas del número, tamaño y distribución topológica de los cuerpos de AcMFP1-90 KDa, ni en el marcado del retículo de la MN, detectándose como único cambio significativo un incremento del número de matrices nucleares sin marcado, que indica que en estas células toda la proteína del núcleo estaba hiper-fosforilada.

La incorporación de grupos fosfatos a AcMFP1-90 KDa provoca una menor afinidad en la unión de la proteína a la MN, ya que se introducen cargas negativas que reducen la interacción electrostática entre la proteína y la molécula de la MN a la que se une, que no ha sido identificada hasta el momento. Este fenómeno es habitual entre las proteínas de la MN, y afecta a las laminas (Gerace y Blobel, 1980), a distintas proteínas remodeladoras de la cromatina pertenecientes a la familia SWI/SNF (Bérubé *et al*, 2000; Reyes *et al*, 1997; Muchardt *et al*, 1996), a NuMA (Saredi *et al*, 1997), al polipéptido p73 de la familia de p53 (Ben-Yehoyada *et al*, 2003), a la proteína HIRA de unión a histonas (De Lucía *et al*, 2001), etc. En todos estos casos la hipo-fosforilación de la proteína correlaciona con una fuerte asociación a la MN, y su hiper-fosforilación con la liberación o una unión más débil a la MN. Se ha demostrado también que la fosforilación juega un papel muy importante en la modulación de la

funcionalidad y asociación al ADN de muchas proteínas nucleares, incluyendo las ARN polimerasas (Albert *et al*, 2004), factores de transcripción (Joaquin y Watson, 2003; Lin y Shalitin, 2003) y proteínas implicadas en la organización de la cromatina (Allard *et al*, 2004; Kamemura y Hart, 2003).

El nivel de fosforilación de AcMFP1-90 KDa aumenta a lo largo del ciclo celular desde G1/S-temprano hasta G2. Este patrón de fosforilación es habitual en proteínas nucleares de unión a la cromatina, a la MN, o a ambas (Miccoli *et al*, 2003; Qiao *et al*, 2001; Minc *et al*, 1999). Un patrón similar de fosforilación durante el ciclo celular se observa para la proteína represora de tumores RB, cuya distribución entre el núcleo y el citoplasma varía de forma dinámica según el estado de fosforilación (Yen *et al*, 1997; Mancini *et al*, 1994), fenómeno que sin embargo no sucede en el caso de AcMFP1-90 KDa, ya que no se han detectado incrementos significativos de la proteína en el citoplasma en ningún momento del ciclo celular.

Nuestros resultados con inhibidores y estimuladores de la CK2 demuestran que AcMFP1-90 KDa es un sustrato de esta enzima. Ésta es la primera vez que se describe la regulación de la asociación de la proteína a la MN por esta kinasa (Moreno Díaz de la Espina *et al*, 2003), ya que sólo muy recientemente se ha descrito que la CK2 inhibe la unión de MFP1 al ADN *in vitro* (Jeong *et al*, 2004). La CK2 es una kinasa de serina-treonina multifuncional presente en el citoplasma y el núcleo de células proliferantes y diferenciadas de plantas, animales y levaduras, asociándose a la matriz nuclear en función de su propio estado de fosforilación (Yu *et al*, 2001; Suk *et al*, 1997). Posee numerosos sustratos nucleares, entre los que se encuentran factores de transcripción y proteínas organizadoras de la cromatina (Barz *et al*, 2003).

La CK2 de plantas está formada por un complejo tetramérico de unidades catalíticas ( $\alpha$ ) y reguladoras ( $\beta$ ) similar al de otros organismos, donde sólo las primeras se expresan de manera constitutiva (Riera *et al*, 2001 a). Está involucrada en procesos esenciales para la viabilidad vegetal, como son la expresión génica regulada por la luz y la progresión del ciclo celular (Riera *et al*,

2001 b). Su actividad es esencial en la iniciación y organización de la actividad meristemática (Espunya y Martínez, 2003), tejido en el que se detectan precisamente los máximos niveles de las proteínas AcMFP1. Se conocen distintos substratos vegetales como Rab17, involucrada en procesos de crecimiento y embriogénesis (Riera *et al*, 2004); CCA-1 (*Circadian Clock Associated-1*) relacionada con el ciclo circadiano y sus efectos sobre por ejemplo el movimiento de las hojas, la apertura de los estomas o la expresión génica (Daniel *et al*, 2004); la Topoisomerasa I y la ADN Helicasa (Tuteja, 2003; Tuteja *et al*, 2001); la proteína SSRP1 relacionada con la transcripción y la replicación (Krohn *et al*, 2003); factores estructurales de la cromatina como las proteínas HMGB y Dof2 (Krohn *et al*, 2002; Stemmer *et al*, 2002); factores de transcripción (Ferraris *et al*, 2002); o proteínas de virus vegetales (Ivanov *et al*, 2003). Sin embargo, las únicas proteínas de matriz nuclear de plantas identificadas como substratos de la CK2 son las proteínas semejantes a laminas de guisante (Li y Roux, 1992), LeMFP1 (Meirer *et al*, 1996), AtMFP1 (Jeong *et al*, 2004) y AcMFP1-90 KDa.

La fosforilación de proteínas nucleares, incluida la producida por la CK2, regula cuatro fenómenos principales: la redistribución de las proteínas entre el núcleo y el citoplasma, su unión al ADN, su ensamblaje en complejos macromoleculares y/o su funcionalidad. Los datos de IF e inmunodetección en membrana sugieren que la fosforilación no influye sobre los patrones de distribución de AcMFP1-90 KDa en el núcleo, ni produce un flujo de la proteína hacia el citoplasma durante el ciclo celular. Recientemente se ha demostrado que la fosforilación por CK2 *in vitro* puede inhibir la unión de MFP1 al ADN, sugiriéndose que la kinasa podría regular la unión MFP1-ADN *in vivo* (Jeong *et al*, 2004). El hecho de que la fosforilación controle la unión de AcMFP1-90 KDa a la MN, sugiere que podría modular también su ensamblaje en esta estructura, y posiblemente su funcionalidad, como sucede en el caso de muchas otras proteínas, como la subunidad AKAP149 de la PP1 (*Protein Phosphatase 1*), que se ensambla sobre la lámina en su estado defosforilado para estabilizar a su vez el ensamblaje de las laminas durante G1. Cuando mediante fosforilación es liberada de la lámina induce la fosforilación y despolimerización de las laminas A

y B, provocando el desensamblaje de la lámina y la envoltura nuclear (Steen et al, 2003).

Además, el hecho de que los tratamientos *in vivo* con drogas inhibitoras y estimuladoras de la CK2 endógena reproduzcan el mismo efecto, sugiere que esta kinasa participaría en la regulación de la unión de la proteína al nucleoesqueleto celular *in vivo*. AcMFP1-90 KDa se comporta como un componente de la MN, aunque nuestros resultados son insuficientes para concluir si forma parte de los filamentos básicos del nucleoesqueleto expansible como EAST (Wasser y Chia, 2000), skeletor (Walker et al, 2000), enaptin y nuance (Padmakumar et al, 2004) en animales, o es una proteína asociada a ellos como NuMA (Yu y Moreno Díaz de la Espina, 1999) y actina (Kiseleva et al, 2004), que presentan una regulación similar por fosforilación-defosforilación.

## **2.2. AcMFP1-90 KDa es la única proteína MFP1 con pI básico**

La utilización del método de *doble solubilización* nos ha permitido calcular el valor experimental de pI de AcMFP1-90 KDa, que no es posible obtener con los métodos habituales de solubilización. Este método ya se había usado con otras proteínas de la MN, como por ejemplo EBNA-5, una de las seis proteínas nucleares del virus Epstein-Barr. En este caso, mediante la combinación de detergentes no iónicos, DNasa, RNasa, Fosfatasa Alcalina, NaCl 1M y/o urea 8M sólo se liberó un 10% de la proteína de la MN, mientras que utilizando 2% SDS y calor se consiguió liberar de la MN la mayor parte de la misma (Szekely et al, 1995).

El método de *doble solubilización* supone una ventaja adicional, y es que la combinación de 2-mercaptoetanol, SDS y calor utilizada durante la primera solubilización rompe los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y cancela las interacciones hidrofóbicas, favoreciendo la completa desnaturalización de AcMFP1-90 KDa y previniendo su agregación con otras proteínas, lo cual evita su migración anómala por asociación a otra proteína, como sucede en el caso de

la nucleolina (Gotzman *et al*, 1997), o que se produzca una desnaturalización incompleta de la proteína exponiéndose sobre su superficie los dominios más básicos, ocultándose en su interior los más ácidos.

El detergente no iónico añadido durante la segunda solubilización desplaza al SDS de la superficie de las proteínas, evitando el efecto de su carga negativa durante el IEF. Esto se pudo comprobar tanto para los marcadores de pI, como para las bandas superior e inferior del doblete de AcMFP1-78 KDa, cuyos pIs experimentales fueron respectivamente de 5,5 y 7,5, independientemente del método de solubilización utilizado. El primero de ellos es similar al valor de pI de MFP1 de tabaco y tomate (Jeong *et al*, 2004; Meier *et al*, 1996). El método de doble solubilización es por tanto fiable, y permite establecer el pI experimental de AcMFP1-90 KDa como inequívocamente básico. Los estados hiper-fosforilados de AcMFP1-90 KDa (pI~8,5) poseen lógicamente un pI más ácido que los hipofosforilados (pI~9,5), debido a la presencia de un mayor número de fosfatos. Son también más solubles, por su mayor contenido de fosfatos y por tanto de grupos hidroxilos que hacen a la proteína más hidrofílica y soluble en medios acuosos, siendo innecesaria la neutralización previa de los enlaces iónicos con NaCl para su solubilización, que se hace necesaria para la *doble solubilización* de los estados hipofosforilados fuertemente anclados a la MN.

La diferencia de pI entre AcMFP1-90 KDa y el resto de las proteínas MFP1, incluida AcMFP1-78 KDa, se debe probablemente a variaciones entre sus secuencias, ya que algunas de ellas están muy poco conservadas (~40%) entre especies (Harder *et al*, 2000). Se han detectado también diferencias interespecíficas de pI en otras proteínas de matriz nuclear (Stuurman *et al*, 1990). Además en el caso de tratarse efectivamente una proteína *ADN-binding*, se sabe que éstas se localizan en dos rangos de pI, uno ligeramente ácido (~5,7) y otro básico (~9,0), donde estaría incluida AcMFP1-90 KDa (Bickmore y Sutherland, 2002).

Este pI experimental básico de AcMFP1-90 KDa contrasta también con el de las proteínas NAC, grupo de siete proteínas nucleares vegetales componentes de



la MN entre las que se encuentra AtMFP1, todas ellas con un extenso dominio *coiled-coil*, una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo carboxilo de la proteína y un *pI* experimental comprendido entre 4,9 y 7,0, y que son candidatas a reemplazar funcionalmente en plantas a las laminas animales (Blumenthal *et al*, 2004).

En el caso de AcMFP1-78 KDa sucede todo lo contrario, tiene un *pI* experimental que está en el rango del de estas proteínas, y es probable que como MFP1 de otras especies posea una señal NLS y un dominio *coiled-coil*, ya que se localiza en el núcleo y forma polímeros con una *Mr* de 160 KDa, es además constitutiva y una fracción de la misma se une a la MN, aunque no forma parte de la misma, mostrando por tanto gran semejanza con las proteínas NAC.

### **3. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AcMFP1 EN DISTINTOS TEJIDOS Y TIPOS CELULARES DE CEBOLLA**

#### **3.1. AcMFP1-78 KDa es una proteína constitutiva de cebolla**

Nuestros resultados suponen el primer estudio comparativo de la expresión o presencia de las proteínas AcMFP1 en células meristemáticas y en distintos tipos celulares dentro de un mismo órgano, donde se han observado variaciones de expresión para las proteínas principales, y detectado isoformas potenciales específicas de tejido y tipo celular.

Independientemente de estas variaciones, se puede afirmar que AcMFP1-78 KDa es una proteína constitutiva de plantas, ya que se ha detectado en todas las células estudiadas, independientemente del tipo, estado de diferenciación y tejido. Esto contrasta con los estudios en distintos tejidos diferenciados de tomate, tabaco y *Arabidopsis*, en los que la expresión de MFP1 parece ser órgano-específica y depender del estado de desarrollo, detectándose los niveles

máximos de expresión en hojas (Jeong *et al*, 2003; Harder *et al*, 2000; Meier *et al*, 1996).

No parecen existir variaciones significativas en los niveles de AcMFP1-78 KDa durante el ciclo celular en células de raíz, lo que sugiere que es poco probable que la proteína pueda estar relacionada con procesos como la señalización de las distintas fases del ciclo o la replicación, como se ha confirmado mediante estudios de co-localización con marcadores de replicación.

Existe un descenso importante en los niveles de la proteína desde la zona de proliferación a las de elongación y maduración de la raíz de cebolla, en la que llega a ser casi indetectable, sugiriendo una menor expresión de la proteína en estas últimas. Este descenso correlaciona con la aparición de un doblete de 63 KDa que no se detecta en células meristemáticas, que podría corresponder a proteínas antigénicamente relacionadas o a isoformas de AcMFP1 expresadas específicamente en estas zonas de la raíz; o a productos de proteólisis fisiológica de AcMFP1-78 KDa, explicando el descenso simultáneo de los niveles de la proteína. En la misma zona radicular y mediante el mismo suero se detecta un patrón de marcado intercromatínico topológicamente diferente de los patrones de AcMFP1-78 KDa, que refleja probablemente la distribución nuclear de los fragmentos proteolíticos o isoformas de 63 KDa.

### **3.2. Localización subcelular de las isoformas de AcMFP1-78 KDa**

Existen tres fracciones de AcMFP1-78 KDa con distinta solubilidad, que se recogen durante la preparación de MNs en los sobrenadantes Cit / S1; S2 y S3. La primera fracción corresponde a la isoforma de mayor Mr del doblete de 78 KDa detectada con el suero 288, que posee un pI experimental de 7,5. Aunque desconocemos su localización subcelular de manera precisa, nuestros resultados de inmunodetección a alta resolución con este suero muestran un marcado sobre estructuras citoplasmáticas esféricas, algunas asociadas a la parte externa de la envoltura nuclear de células de raíz, cuyo contenido polipeptídico

esperaríamos recoger precisamente en los sobrenadante Cif y S1, y que por su morfología y localización perinuclear podrían corresponder a plastidios inmaduros ricos en esta isoforma de AcMFP1-78 KDa, similares a los descritos por Meier y colaboradores en células de tabaco en suspensión (Jeong *et al*, 2003; Gindullis y Meier, 1999).

La segunda fracción, extraída junto con el ADN y sus proteínas asociadas y recogida en el sobrenadante S2, se localiza fundamentalmente en los focos nucleares. Hemos demostrado mediante inmunomarcado de alta resolución que estos focos se corresponden con pequeños dominios situados en la periferia de la heterocromatina, donde se localizan entre otras estructuras los lazos de la cromatina activa (González-Melendi *et al*, 1998), a los que podría asociarse de conservarse la capacidad de unir ADN típica de MFP1 en otras especies (Jeong *et al*, 2003; Meier *et al*, 1996).

La tercera fracción de AcMFP1-78 KDa se extrae con alta fuerza iónica de la matriz nuclear recogién dose en el sobrenadante S3, junto con el resto de las proteínas nucleares que se unen *débilmente* a la MN, incluidas las formas hiperfosforiladas de AcMFP1-90 KDa. La distribución subnuclear de esta fracción de AcMFP1-78 KDa por el retículo de la MN, a la que se une pero de la que no forma parte, se puede observar mediante el suero 91 en núcleos extraídos con detergente, DNasa y baja fuerza iónica, al no mezclarse con la señal de las otras dos fracciones de la proteína que ya han sido extraídas.

Existen cambios en los patrones de distribución de la proteína correlacionados con distintas fases del ciclo y actividades celulares, siendo los más llamativos los producidos entre células proliferantes y diferenciadas. La distribución de AcMFP1-78 KDa en células proliferantes de la raíz, donde los niveles de la proteína doblan ampliamente a los de células diferenciadas, coincide mayoritariamente con el modelo *punteado* de distribución de los focos; mientras que en las células no-meristemáticas se detectan dos poblaciones celulares, que presentan los patrones *punteado* y *reticulado*, siendo el último el mayoritario. Esta redistribución de los focos de AcMFP1-78 KDa entre células

proliferantes y diferenciadas es similar a la de muchas proteínas organizadoras de la cromatina, que son redistribuidas durante la reestructuración de la eucromatina en los cambios de expresión génica que suceden durante la transición proliferación-diferenciación (Parada *et al*, 2004; Reimer *et al*, 2003), y que obedecen en la mayoría de los casos a modificaciones postraduccionales, como sucede por ejemplo con las proteínas HMG de unión a los nucleosomas, la nucleolina o el factor UBF (Tu *et al*, 2003; Hock *et al*, 1998), estando dichas modificaciones aún por determinar en el caso de AcMFP1-78 KDa.

Se ha detectado también un pequeño porcentaje de células de la zona de proliferación en la fase G2 del ciclo celular que sigue el patrón *reticulado* para los focos de AcMFP1-78 KDa. Esta redistribución de los focos del patrón *punteado* al *reticulado* podría ser rápida, transitoria y producirse en todas las células proliferantes antes de su entrada en mitosis; aunque también podría afectar a una pequeña fracción celular de la zona de proliferación que comienza a diferenciarse durante su "última" fase G2, ya que en la zona de elongación adyacente muchas de las células que siguen el patrón *reticulado* muestran contenidos 4C de ADN.

En el nucleolo, AcMFP1-78 KDa se distribuye de manera relativamente homogénea y sin asociación preferente con ninguno de sus tres subdominios funcionales, lo que descartaría una asociación de la proteína al ADN descondensado como en el nucleoplasma, ya que éste se localiza en la periferia de los centros fibrilares (Shaw *et al*, 2002; González-Melendi *et al*, 2001; Bassy *et al*, 2000). La localización nucleolar de AcMFP1-78 KDa no es constante en todas las células, siendo poco frecuente en las proliferantes y frecuente en las células diferenciadas. Existe proteína nucleolar en todos los nucleolos de células de hojas, y sin embargo en ninguno en las de la zona de elongación radicular. Esto indica que la proteína no tendría una función en la actividad biosintética del nucleolo, sino que estaría relacionada con otras funciones nucleolares distintas de la biosíntesis de ribosomas, como la maduración y el "secuestro" de proteínas (Catala *et al*, 2004; Eilbracht *et al*, 2004; Le Goff *et al*, 2004; Gao *et al*, 2003; Olson *et al*, 2002; Pederson, 2002). Esta posibilidad no se podrá comprobar hasta

conocer más detalladamente su funcionalidad y dinámica intranuclear, o la existencia de una cadena de modificaciones en subdominios concretos del núcleo.

Los focos de AcMFP1-78 KDa se localizan en la región intercromatínica siguiendo el retículo intranuclear. En algunos casos adoptan posiciones adyacentes a los cuerpos de Cajal, en lo que podría ser una interacción transitoria entre ambos dominios nucleares, como sucede con otros cuerpos nucleares anclados a la MN (Ariumi *et al*, 2003; Weger *et al*, 2003), aunque también podría ser una coincidencia provocada por la alta densidad nuclear de ambas estructuras. A su vez, el análisis de co-localización de los focos de AcMFP1 y los de síntesis activa de ADN descarta su implicación directa en los procesos de replicación, aunque demuestre la presencia de ADN en al menos una proporción de focos de AcMFP1-78 KDa.

### **3.3. AcMFP1-78 KDa posee una doble localización nuclear y cloroplástica, pero no co-localiza con el ADN condensado del nucleoide**

El genoma del cloroplasto se organiza en estructuras denominadas nucleoides, cuya morfología, número, tamaño y localización cambian durante el desarrollo de los plastidios a cloroplastos maduros fotosintéticamente competentes, así como durante su conversión a otro tipo de plastidios (Kuroiwa, 1991). El genoma del cloroplasto codifica productos génicos involucrados en la fotosíntesis y la cadena de transferencia de electrones, así como proteínas que forman parte de la maquinaria transcripcional y traduccional del orgánulo, aunque la mayoría de las proteínas del cloroplasto están codificadas en el núcleo y se importan postraduccionalmente (Chi-Ham *et al*, 2002). El nucleoide es un complejo de unas 2µm formado por unas diez copias de ADN cloroplástico, ARN, enzimas de transcripción y replicación, factores de transcripción y proteínas estructurales de unión a ADN (Sato, 2001), aunque poco se sabe sobre estas últimas; ni sobre el mecanismo de organización topológica del ADN del



cloroplasto (Kobayashi *et al*, 2002). Se han descrito algunas de ellas, aunque ninguna posee una Mr de 80 KDa como MFP1 (Sato, 2001), y sólo STEP1 (*Single-stranded TElomere-binding Protein 1*) ha sido recientemente descrita como proteína con una doble localización en núcleos y cloroplastos (Kwon y Chung, 2004).

Ambos sueros anti-MFP1 detectan la proteína en los cloroplastos maduros de hojas de tabaco, *Arabidopsis* y cebolla, y por tanto en este último caso se trataría de la isoforma de 78 KDa, ya que es la única detectada por ambos sueros. MFP1 se acumula en focos de tamaño similar al del nucleóide, aunque normalmente en mayor número, y no co-localiza con el ADN condensado del mismo, como demuestra la tinción con DAPI, en contra de lo que se había propuesto (Jeong *et al*, 2003). Las señales de fluorescencia de MFP1 coinciden con las del ADN cloroplástico descondensado, distribuidas por distintas zonas del cloroplasto, y conectadas entre sí en muchos casos (Sato, 2001). La coincidencia topológica en estas regiones sería compatible con la interacción propuesta entre MFP1 y el ADN (Jeong *et al*, 2003), ya que la fracción nuclear de la proteína también interacciona con las regiones menos condensadas del ADN nuclear. El patrón de distribución de MFP1 en el cloroplasto está altamente conservado entre especies, a diferencia del patrón nuclear, que varía según las características ultraestructurales específicas de sus núcleos. Esta distribución conservada de la proteína refleja a su vez la organización conservada del cloroplasto, debido probablemente a su común origen unicelular ancestral (Koumandou *et al*, 2004).

#### **3.4. AcMFP1-90 KDa no es una proteína constitutiva de cebolla**

A diferencia de AcMFP1-78 KDa, la proteína de 90 KDa no es constitutiva ya que no está presente en todas las células, y su patrón de expresión varía entre células de un mismo órgano. Los estudios comparativos de los niveles de AcMFP1-90 KDa en células sincronizadas muestran que no existen variaciones durante el ciclo celular, aunque la aparición de formas hiper-fosforiladas de la proteína al

final de la fase de síntesis y durante G2, que no afectan de manera apreciable a la distribución de la proteína, podría estar asociada a su desensamblaje de la MN previo a la mitosis, lo que como se ha descrito anteriormente es muy frecuente en las proteínas del nucleoesqueleto, como sucede con NuMA por ejemplo (Saredi *et al*, 1997).

Los estudios de inmunodetección en membrana demuestran variaciones significativas en los niveles de AcMFP1-90 KDa entre las distintas zonas de la raíz, siendo más abundante la proteína en células proliferantes que en diferenciadas. Aunque existe una relación clara entre el descenso de los niveles de la proteína y la reducción del número de cuerpos a lo largo de la raíz, no podemos asegurar que ésta última esté producida por la disminución de la expresión de la proteína, ya que no tenemos una estimación de la concentración total de proteína en los cuerpos y además éstos podrían fusionarse, como hacen por ejemplo los cuerpos de Cajal (Boudonck *et al*, 1999).

Nuestros resultados demuestran una expresión órgano-específica de MFP1 de acuerdo con la descrita en otras especies, donde se expresa en una forma (Harder *et al*, 2000), pero además reflejan diferencias de expresión dentro de un mismo órgano vegetal, indicando la existencia de un nivel más fino de regulación.

### **3.5. AcMFP1-90 KDa se localiza asociada al nucleoesqueleto y en una nueva categoría de cuerpos nucleares**

Nuestros resultados sobre la expresión de AcMFP1 son novedosos y serán sin duda de gran utilidad para el futuro descubrimiento de la función(es) de la proteína, pero los resultados quizá más interesantes sobre AcMFP1-90 KDa sean los relacionados con su distribución intranuclear, ya que es una de las pocas proteínas descritas del nucleoesqueleto de plantas (Samaniego *et al*, 2001; Samaniego, 1999), junto con las proteínas semejantes a laminas (Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993), NMCP1 (Masuda *et al*, 1999), los homólogos de

NuMA (Yu y Moreno Díaz de la Espina, 1999) y las proteínas nucleares tipo filamento intermedio (Blumenthal *et al*, 2004).

Además, cantidades importantes de la proteína se acumulan en una nueva categoría de cuerpos nucleares, distintos en tamaño, número y distribución de los cuerpos descritos hasta el momento, no sólo en cebolla, sino en plantas en general, entre los que se encuentran los cuerpos de Cajal (Cui y Moreno Díaz de la Espina, 2003) y los cuerpos de COP1 (Reyes, 2001). Son diferentes también de las estructuras centroméricas, que constituyen subdominios nucleares ultraestructuralmente distinguibles mediante ME, y que como en el caso de los cuerpos de Cajal carecen de marcado significativo con los sueros anti-MFP1.

El análisis estadístico del número de cuerpos *marcados* en distintos tipos de células y tejidos, muestra la existencia de cuatro grupos celulares con diferencias significativas en sus medias de cuerpos de AcMFP1-90 KDa: las más altas corresponden a las células proliferantes, independientemente de la fase del ciclo celular; le siguen las células no meristemáticas de las hojas crecidas en presencia de un ciclo de luz/oscuridad; el tercer grupo lo constituyen las células meristemáticas en estado durmiente o quiescente; y el último grupo está formado por las células en distintos estados de diferenciación de las zonas de elongación y maduración de la raíz, y por las células no meristemáticas de hojas crecidas en total oscuridad. Estos cuatro grupos muestran claramente que el número de cuerpos, y quizá la expresión de la proteína, están estimulados por la proliferación celular y la luz, en el caso de las células no meristemáticas; aunque también podría suceder que el número de cuerpos se vea disminuido durante la diferenciación celular.

La localización de AcMFP1-90 KDa en el nucleoesqueleto y en cuerpos anclados al mismo sugieren un papel estructural para la proteína en la matriz nuclear, desde donde podría participar en la organización del genoma y/o los subdominios funcionales del núcleo. Sin embargo, es poco probable que AcMFP1-90 KDa constituya los filamentos básicos del nucleoesqueleto vegetal, ya

que ni se distribuye de forma regular por los mismos (Samaniego *et al*, 2001; Samaniego, 1999), ni se expresa de manera constitutiva, que sería lo esperable para una proteína de este tipo.

AcMFP1-90 Kda presenta similitudes con la proteína 4.1 de la MN de células animales, principalmente en la existencia de isoformas y la localización de la proteína fosforilada, que refuerzan la hipótesis de que MFP1 tiene un papel estructural en el nucleoesqueleto de plantas.

La proteína 4.1 presenta numerosas bandas nucleares inmunoreactivas con características de solubilidad y Mr muy parecidas a algunas de las bandas de la familia de proteínas antigénicamente relacionadas con MFP1 en cebolla, incluyendo entre otras una banda de 55 KDa detectada en la fracción citoplasmática y en el sobrenadante recogido tras la extracción con detergente; un doblete de 75 KDa en el que la banda superior permanece unida a la MN y la inferior se extrae con detergente; y dos bandas de 135 y 175 KDa extraíbles con DNasa y sulfato amónico (de Cárcer *et al*, 1995). Estas isoformas se generan mediante el uso variable de sitios de iniciación de la traducción, *splicing* alternativo y modificaciones postraduccionales, incluida la fosforilación (Krauss *et al*, 1997; Correas, 1991). La fracción nuclear de la proteína 4.1 se redistribuye durante el ciclo celular y el desarrollo por la MN (Krauss *et al*, 2002). Posee dos secuencias NLS y distintos dominios que le permiten interaccionar con NuMA, y formar estructuras triméricas con la actina y la espectrina (Krauss *et al*, 2002 y 1997; de Cárcer *et al*, 1995).

Se ha comprobado recientemente mediante feSEM que la proteína 4.1 se distribuye de forma periódica sobre los filamentos del nucleoesqueleto, acumulándose además en estructuras esféricas nucleares no identificadas (Kiseleva *et al*, 2004), lo que supone una distribución similar a la de AcMFP1-90 KDa, detectada mediante inmunomarcado para ME en cortes semifinos sin resina (Samaniego *et al*, 2001; Samaniego, 1999).

La proteína 4.1 forma parte de un grupo emergente de proteínas estructurales clásicas del citoesqueleto que están revelando también como proteínas estructurales del nucleoesqueleto, como la actina y sus proteínas relacionadas (ARPs: *Actin Related Proteins*), la miosina y la espectrina (Bettinger *et al*, 2004); los heterólogos de esta última se han detectado en la matriz nuclear vegetal (De Ruijter *et al*, 2000), y también se han descrito varios tipos de ARPs en el núcleo vegetal (Kandasamy *et al*, 2004). Estas proteínas podrían formar parte de la estructura del nucleoesqueleto (Bettinger *et al*, 2004), y más concretamente de la red de filamentos que conecta los poros nucleares con regiones perinucleolares y con distintos cuerpos nucleares, en la que se han detectado la actina y la proteína 4.1 (Kiseleva *et al*, 2004), proteínas clásicas de la matriz nuclear como EAST, *skeletor*, *enaptin* y *nuance* (Bettinger *et al*, 2004; Padmakumar *et al*, 2004; Wasser y Chia, 2000; Walker *et al*, 2000), y proteínas *coiled-coil* como TRP (*Translocated Promoter Region*) (Fontoura *et al*, 2001). Se piensa que esta red de filamentos forma un espacio intercromatínico protegido de la oclusión de la cromatina, que constituye una red de "canales de difusión" a través de la cromatina, desde y hacia los poros nucleares y distintos subdominios nucleares, involucrada en la arquitectura nuclear y en el transporte de moléculas por el núcleo (Kiseleva *et al*, 2004).

#### **4. IMPLICACIONES FUNCIONALES DE MFP1**

Los estudios ultraestructurales de microscopía electrónica muestran que las proteínas AcMFP1 se distribuyen en pequeños subdominios y cuerpos nucleares situados en la región intercromatínica, dominio nuclear en el que se localizan, entre otros, los complejos de replicación del ADN, los de transcripción y procesamiento del ARN, las moléculas de ácidos nucleicos que van siendo sintetizadas, los cuerpos de Cajal, los gránulos intercromatínicos, los lazos de cromatina activa descondensada, y la matriz nuclear que los organiza a todos ellos (Jaunin y Fakan, 2002; Shaw *et al*, 2002; González-Melendi *et al*, 1998). Los estudios de co-localización con distintos marcadores nucleares han demostrado que no existe una asociación espacial preferente o significativa de las proteínas



AcMFP1 con los focos de replicación, ni con los de transcripción-procesamiento; ni tampoco con los sitios de acumulación y maduración de los snRNAs como los cuerpos de Cajal o los gránulos intercromatínicos.

Los estudios de fraccionamiento celular han demostrado a su vez que las proteínas MFP1 forman parte de la MN, y que en el caso de AcMFP1-78 KDa una fracción de la proteína podría estar unida a matriz, mientras que otra se uniría a la cromatina. Estudios anteriores habían demostrado también que MFP1 puede reconocer y unir secuencias MAR (Meier *et al*, 1996) y/o ADN (Jeong *et al*, 2004 y 2003), aunque en nuestro caso no disponemos de las pruebas directas que demuestran dicha capacidad para las proteínas de cebolla, al no ser definitivos nuestros resultados de *South-Western*. Si a todo lo anterior se suma el hecho de que presentan cierta similitud de secuencia con proteínas componentes de la matriz nuclear como las laminas, NuMA y la miosina (Meier *et al*, 1996), así como su semejanza en muchos aspectos con la proteína 4.1 del nucleoesqueleto animal, se podría sugerir que MFP1 es una proteína estructural de la matriz nuclear, y que podría participar en algunas(s) de las funciones de la misma, desde las relacionadas con la arquitectura nuclear y la organización del genoma, hasta las implicadas indirecta pero vitalmente en procesos nucleares como la expresión génica, cuyos complejos enzimáticos y factores de regulación se ensamblan y organizan sobre la MN (Jackson, 2003 a, b).

Nuestros resultados sobre la distribución subcelular de MFP1 suponen un importante avance en el conocimiento de MFP1, ya que hasta el momento no se había podido demostrar la distribución de la proteína en el núcleo (Jeong *et al*, 2003; Gindullis y Meier, 1999), ni tampoco su asociación a la matriz nuclear. Se había sugerido incluso que las bandas de MFP1 detectadas en las fracciones nucleares de distintas especies podrían corresponder a contaminaciones con la proteína de los cloroplastos (Jeong *et al*, 2003). Nuestro protocolo de incubación de núcleos en suspensión ha permitido la incorporación de los sueros anti-MFP1 a su interior, detectando la proteína de manera inequívoca en subdominios nucleares de cuatro especies distintas. Aunque los cloroplastos contaminan las fracciones de núcleos aislados de hoja, ya que ambos orgánulos co-purifican

durante el fraccionamiento celular, las técnicas de inmunodetección *in situ* permiten determinar con precisión la distribución de las proteínas en cada uno de ellos.

Los estudios previos de localización de MFP1-GFP en células transfectadas de tabaco en suspensión, sólo habían permitido detectar la proteína de fusión en los plastidios vegetales que rodean al núcleo (Jeong *et al*, 2003; Gindullis y Meier, 1999), donde al contrario que en los núcleos no parecen existir limitaciones de acceso para la proteína quimérica. Nuestros resultados de IF demuestran que MFP1 está también localizada en los cloroplastos maduros de hojas de plantas silvestres.

Aparte de la función o funciones exactas de MFP1, existen otras cuestiones desconocidas actualmente, como si la funcionalidad nuclear de MFP1 está conservada en el cloroplasto, o en el caso de cebolla si las dos proteínas AcMFP1 comparten una misma función.

Evidentemente no podemos resolver estas cuestiones con total fiabilidad, pero nuestros resultados serían compatibles con una función organizadora del ADN en el núcleo y el cloroplasto, ya que en ambos orgánulos MFP1 se localiza en dominios donde existe ADN descondensado de ambos genomas. En el caso de cebolla, las diferencias entre las dos proteínas AcMFP1 principales son importantes, AcMFP1-78 KDa es constitutiva y está asociada a la eucromatina y la MN; mientras que AcMFP1-90 KDa no es constitutiva, sigue patrones de expresión relacionados con la proliferación celular y la luz, y es una proteína estructural de la matriz nuclear. Todo ello sugiere que podrían ejercer funciones nucleares diferentes, o al menos que ejercen una función similar reguladas de distinta manera.

Hemos culminado con éxito la mayoría de los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral, caracterizando dos proteínas principales homólogas de MFP1 en cebolla, lo que supone una interesante peculiaridad para la especie, ya que en el resto de los organismos estudiados sólo se ha detectado una proteína. Se han

descrito por primera vez sus patrones de expresión y distribución nuclear a lo largo del ciclo celular, y en distintos tipos celulares y tejidos vegetales; habiéndose demostrado también que la CK2 endógena es capaz de regular la unión de AcMFP1-90 KDa a la MN.

Aunque no hemos logrado esclarecer la funcionalidad exacta de MFP1, se han acotado de manera significativa las distintas posibilidades, al descartar su implicación directa en la replicación del ADN, la transcripción y el procesamiento del ARNm, la maduración de los snRNAs en los cuerpos de Cajal y gránulos intercromatínicos, así como la organización de la heterocromatina y las estructuras centroméricas. Las isoformas de AcMFP1 de 78 KDa y 90 KDa ejercen sus funciones asociadas a la eucromatina y el nucleoesqueleto, respectivamente. AcMFP1-90 KDa es probablemente una proteína estructural del nucleoesqueleto, pudiendo participar en la organización del genoma y/o la de los distintos dominios nucleares, y se acumula en cuerpos nucleares que no habían sido descritos hasta el momento. Hemos demostrado además que existe una fracción nuclear de MFP1 y que forma parte de la MN en distintas especies vegetales, y otra segunda fracción de MFP1 en los cloroplastos maduros de hoja, donde presenta un patrón de distribución conservado entre especies, sin que se produzca co-localización total entre la proteína y el nucleoide, pero con interacción con el ADN descondensado del cloroplasto.

CONCLUSIONES

1- Existen dos homólogos principales de la proteína MFP1 en *Allium cepa*: AcMFP1-90 KDa y AcMFP1-78 KDa, éste último con valores de movilidad relativa y de pI (~5,5) similares a los de MFP1 en otros sistemas vegetales.

2- Existen dos fracciones subnucleares de AcMFP1-78 KDa con distinta solubilidad. La primera se extrae de los núcleos mediante baja fuerza iónica, mientras que la segunda se une débilmente a la matriz nuclear siendo necesario utilizar alta fuerza para su extracción.

3- AcMFP1-78 KDa presenta un estado polimerizado detectado como una banda de 160 KDa, que sólo se desnaturaliza completamente mediante calor y altas concentraciones de detergente y urea.

4- AcMFP1-78 KDa es una proteína constitutiva, detectada en el núcleo de células proliferantes, y en el de células durmientes y diferenciadas de raíz y de hoja de cebolla. En la raíz, la máxima expresión de la proteína se detecta en las células meristemáticas, siendo menor en las no meristemáticas.

5- La proteína AcMFP1-78 KDa se distribuye por tres subdominios nucleares: en numerosos focos de 100-300 nm de diámetro, en el nucleolo y de forma dispersa por el retículo nucleoplásmico, redistribuyéndose entre ellos en función del tipo celular. Los focos de marcado pueden adoptar dos patrones de distribución, uno *punteado* donde aparecen distribuidos por todo el espacio nuclear de células meristemáticas y no meristemáticas, a excepción del nucleolo; y un patrón *reticulado* detectado principalmente en células no meristemáticas y caracterizado por su coexistencia con una red nuclear sin marcado.

6- Los focos de marcado detectados mediante inmunofluorescencia se observan mediante microscopía electrónica como estructuras laxas distribuidas por la periferia de las masas densas de cromatina. El resto del marcado es más disperso y se distribuye preferentemente por la región intercromatínica y el nucleolo.



7- El suero 288 detecta una isoforma adicional de AcMFP1-78 KDa con diferencias mínimas de Mr y pl, observada como la banda inferior de un doblete de 78 KDa en geles de electroforesis, y se comporta como una proteína nuclear soluble y/o asociada a la envoltura nuclear.

8- AcMFP1-78 KDa no forma parte de los complejos de transcripción y *splicing* del pre-ARNm, la maduración del snRNA ni la replicación del ADN, a pesar de la semejanza entre el patrón *punteado* de AcMFP1-78 KDa y el patrón III de los focos de replicación.

9- La proteína AcMFP1-90 KDa presenta distintos estados de fosforilación, y su asociación a la matriz nuclear está regulada mediante Caseína Kinasa CK2. Las formas hipofosforiladas, cuyo valor de pl es ~9,5, permanecen fuertemente unidas a la MN, resistiendo una extracción con alta fuerza iónica; mientras que las hiperfosforiladas, cuyo pl es de ~8,5, están asociadas más débilmente y se extraen con alta fuerza iónica. En células proliferantes la fosforilación varía a lo largo del ciclo celular, aumentando las formas hiperfosforiladas de manera creciente en el S-tardío y G2.

10- AcMFP1-90 KDa no es una proteína constitutiva, y su expresión varía en función del tipo celular y la presencia de luz. Se distribuye por el retículo de la matriz nuclear, y se acumula en cuerpos nucleares de tamaño variable comprendidos en dos rangos de diámetro: ~1,7  $\mu\text{m}$  y ~0,9  $\mu\text{m}$ .

11- El número de cuerpos nucleares de AcMFP1-90 KDa alcanza máximos en células no meristemáticas de hoja crecidas en presencia de luz y en células proliferantes de raíz, en estas últimas su número y distribución no varía a lo largo del ciclo celular.

12- AcMFP1-78 KDa, al igual que NtMFP1 y AtMFP1, posee una doble localización en el núcleo celular y los cloroplastos, en estos últimos MFP1 muestra un marcado en focos y difuso por el retículo del cloroplasto, y no colocaliza con

el ADN condensado del nucleóide, aunque podría hacerlo con el ADN cloroplástico descondensado.

13- Debido a sus características, AcMFP1-78 KDa podría ser una proteína relacionada con la eucromatina, mientras que las de AcMFP1-90 KDa apuntan a una proteína estructural del nucleoesqueleto, donde podría participar en alguna(s) de las funciones atribuidas a esta estructura.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Acevedo R, Samaniego R y Moreno Díaz de la Espina S** (2002) *Coiled bodies in nuclei from plant cells evolving from dormancy to proliferation.* Chromosoma, **110**: 559-569.
- **Albert AL, Lavoise SB y Vincent M** (2004) *Multisite phosphorylation of Pin1-associated mitotic phosphoproteins revealed by monoclonal antibodies MPM-2 and CC-3.* BMC Cell Biol. (en prensa).
- **Alcobia I, Quina AS, Neves H, Clode N y Parreira L** (2003) *The spatial organization of centromeric heterochromatin during normal human lymphopoiesis: evidence for ontogenically determined spatial patterns.* Exp. Cell Res., **290**: 358-369.
- **Allard S, Masson JY y Cote J** (2004) *Chromatin remodelling and maintenance of genome integrity.* Biochim. Biophys. Acta, **1677**: 158-164.
- **Allen GC, Spiker S y Thompson WF** (2000) *Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing.* Plant Mol. Biol., **43**: 361-376.
- **Ariumi Y, Ego T, Kaida A, Matsumoto M, Pandolfi PP y Shimotohno K** (2003) *Distinct nuclear body components, PML and SMRT, regulate the trans-acting function of HTLV-1 Tax oncoprotein.* Oncogene, **22**: 1611-1619.
- **Barboro P, D'Arrigo C, Mormino M, Coradeghini R, Parodi S, Patrone E y Balbi C** (2003) *An intranuclear frame for chromatin compartmentalization and higher order folding.* J. Cell. Biochem., **88**: 113-120.
- **Barnes RB, James AM y Jamieson G** (1985) *The organisation, nucleotide sequence, and chromosomal distribution of a satellite DNA from Allium cepa.* Chromosoma, **92**: 185-192.
- **Barz T, Ackermann K, Dubois G, Ellis R y Pyerin W** (2003) *Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodelling.* J. Cell Sci., **116**: 1563-1577.
- **Bassy O, Jiménez-García LF, Echeverría OM, Vázquez-Nin GH y Moreno Díaz de la Espina S** (2000) *High resolution detection of fRNA and rDNA in plant nucleoli with different activities by in situ hybridization.* Biol. Cell, **92**: 59-70.
- **Beemster GTS, Florani F e Inzé D** (2003) *Cell cycle: the key to plant growth control?* Trends Plant Sci., **8**: 154-158.
- **Belmont A** (2003) *Dynamics of chromatin, proteins, and bodies within the cell nucleus.* Curr. Opin. Cell Biol., **15**: 304-310.

- **Ben-Yehoyada M, Ben-Dor I y Shaul Y** (2003) *c-Abl tyrosine kinase selectively regulates p73 nuclear matrix association.* J. Biol. Chem., **278**: 34475-34482.
- **Berezney R y Coffey DS** (1974) *Identification of a nuclear protein matrix.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **60**: 1410-1417.
- **Bérubé NG, Smeenk CA y Picketts DJ** (2000) *Cell cycle-dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association.* Hum. Mol. Gen., **9**: 539-547.
- **Bettlinger BT, Gilbert DM y Amberg DC** (2004) *Actin up in the nucleus.* Nature, **5**: 410-415.
- **Bickmore WA y Sutherland HE** (2002) *Addressing protein localization within the nucleus.* EMBO J., **21**: 1248-1254.
- **Blumenthal SSD, Clark GB y Roux SJ** (2004) *Biochemical and immunological characterization of pea nuclear intermediate filament proteins.* Planta, **218**: 965-975.
- **Bode J, Goetze S, Heng H, Krawetz SA y Benham C** (2003) *From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics.* Chromosome Res., **11**: 435-445.
- **Bollen M y Beullens M** (2002) *Signalling by protein phosphatases in the nucleus.* Trends Cell Biol., **12**: 138-145.
- **Boudonck K, Dolan L y Shaw PJ** (1999) *The movement of coiled bodies visualized in living plant cells by the green fluorescent protein.* Mol. Biol. Cell, **10**: 2297-2307.
- **Brower C, Bruce W, Maddock S, Avramova Z y Bowen B** (2002) *Suppression of transgene silencing by matrix attachment regions in maize: a dual role for the maize 5' ADH1 matrix attachment region.* Plant Cell, **14**: 2251-2264.
- **Brown KE** (2003) *Chromatin folding and gene expression: new tools to reveal spatial organization of genes.* Chromosome Res., **11**: 423-433.
- **Burkhard P, Strelkov SV y Stetefeld J** (2001) *Coiled coils: a highly versatile protein folding motif.* Trends Cell. Biol., **11**: 82-88.
- **Calikowsky TT, Meulia T y Meier I** (2003) *A proteomic study of the Arabidopsis nuclear matrix.* J. Cell. Biochem., **90**: 361-378.



- **Catala M, Lamontagne B, Larose S, Ghazal G y Abou Elela S** (2004) Cell cycle dependent nuclear localization of yeast RNase III is required for efficient cell division. *Mol. Biol. Cell*, **16** (en prensa).
- **Cerezuela MA** (1991) *Efectos del procedimiento de extracción en la organización estructural y composición química de la matriz nuclear de plantas*. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.
- **Černa A, Cuadrado A, Jouve N, Moreno Díaz de la Espina y de la Torre C** (2004) Z-DNA, a new in situ marker for transcription. *Eur. J. Histochem.*, **48**: 49-56.
- **Chi-Ham CL, Keaton MA, Cannon GC y Heinhorst S** (2002) The DNA-compacting protein DCP68 from soybean chloroplasts is ferredoxin:sulfite reductase and co-localizes with the organellar nucleoid. *Plant Mol. Biol.*, **49**: 621-631.
- **Christensen MO, Larsen MK, Barthelemy HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F y Mielke C** (2002) Dynamics of human DNA topoisomerase  $\alpha$  and  $\beta$  in living cells. *J. Cell Biol.*, **157**: 31-44.
- **Chua YL, Watson LA y Gray JC** (2003) The transcriptional enhancer of the pea plastocyanin gene associates with the nuclear matrix and regulates gene expression through histone acetylation. *Plant Cell*, **15**: 1468-1479.
- **Cook PR** (2002) Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nat. Genetics*, **32**: 347-352.
- **Correas I** (1991) Characterization of isoforms of protein 4.1 present in the nucleus. *Biochem. J.*, **279**: 581-585.
- **Cui P y Moreno Díaz de la Espina S** (2003) Sm and U2B'' proteins redistribute to different nuclear domains in dormant and proliferating onion cells. *Planta*, **217**: 21-31.
- **Cupo JF** (1991) Electrophoretic analysis of nuclear matrix proteins and the potential clinical applications. *J. Chromatogr.*, **569**: 389-406.
- **Daniel X, Sugano S y Tobin EM** (2004) CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 3292-3297.
- **De Cárcer G, Lallena MJ y Correas I** (1995) Protein 4.1 is a component of the nuclear matrix of mammalian cells. *Biochem. J.*, **312**: 871-877.

- **De Lucía F, Lorain S, Scamps C, Gallsson F, Machold J y Lipinski M** (2001) *Subnuclear localization and mitotic phosphorylation of HIRA, the human homologue of Saccharomyces cerevisiae transcriptional regulators Hir1p / Hir2p*. Biochem. J., **358**: 447-455.
- **De Ruijter NC, Ketelaar T, Blumenthal SS, Emons AM y Schel JH** (2000) *Spectrin-like proteins in plant nuclei*. Cell Biol. Int., **24**: 427-438.
- **Dechat T, Gotzmann J, Stockinger A, Harris CA, Talle MA, Siekierka JJ y Foisner R** (1998) *Detergent-salt resistance of LAP2 $\alpha$  in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in nuclear assembly implies functions in nuclear structure dynamics*. EMBO J., **17**: 4887-4902.
- **Droillard MJ, Güclü J, Le Caer JP, Mathieu Y, Guen J y Laurière C** (1997) *Identification of calreticulin-like protein as one of the phosphoproteins modulated in response to oligogalacturonides in tobacco cells*. Planta, **202**: 341-348.
- **Dunn OJ** (1964) *Multiple comparisons using rank sums*. Technometrics, **6**: 241-252.
- **Echeverría O, Vázquez-Nin G, Moreno Díaz de la Espina S** (2004) *Redistribution of splicing factors and transcription sites in the nuclei of the radicle during tomato seed germination*. Planta (en prensa).
- **Eilbracht J, Reichenzeller M, Hert M, Schnolzer M, Held H, Stohr M, Franke WW y Schmidt-Zachmann MS** (2004) *NO66, a highly conserved dual location in the nucleolus and in a special type of synchronous replicating chromatin*. Mol. Biol. Cell., **15**: 1816-1832.
- **Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Harmala-Brasken AS, Hellman J, Chou YH y Goldman RD** (2004) *Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments*. J. Cell Sci., **117**: 919-932.
- **Espunya MC y Martínez MC** (2003) *In situ hybridization analysis of protein kinase CK2 expression during plant development*. Physiol. Plant., **117**: 573-578.
- **Fawcett DW** (1966) *An atlas of fine structure*. En "The Cell, Its Organelles and Inclusions". Saunders, Philadelphia, USA.

- **Ferraris JD, Williams CK, Persaud P, Zhang Z, Chen Y y Burg MB** (2002) Activity of the *JonEBP/OREBP* transactivation domain varies directly with extracellular NaCl concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 739-744.
- **Fontoura BMA, Dales S, Blobel G y Zhong H** (2001) The nucleoporin *Nup98* associates with the intranuclear filamentous protein network of *TPR*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 3208-3213.
- **Frederick, S.E., Mangan, M., Carey, J. y Gruber, P.** (1992) Intermediate filaments antigens of 60 and 65 KDa in the Nuclear Matrix of plants: their detection and localization. *Exp. Cell Res.*, **199**, 213-222.
- **Friso G y Wikström L** (1999) Analysis of proteins from membrane-enriched cerebellar preparations by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, **20**: 917-927.
- **Gao H, Chen XB y McGowan CH** (2003) *Mus81* endonuclease localizes to nucleoli and to regions of DNA damage in human S-phase cells. *Mol. Biol. Cell*, **14**: 4826-4834.
- **Gerace L y Blobel G** (1980) The nuclear envelope lamina is reversible depolymerized during mitosis. *Cell*, **19**: 277-287.
- **Gerbi SA, Borovjagin AV y Lange TS** (2003) The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**: 318-325.
- **Gindullis F y Meier I** (1999) Matrix attachment region-binding protein *MFP1* is localized in discrete domains at the nuclear envelope. *Plant Cell*, **11**: 1117-1128.
- **Gindullis F, Rose A, Patel S y Meier I** (2002) Four signature motifs define the first class of structurally related large coiled-coil proteins in plants. *BMC Genomics*, **3**: 9.
- **González-Melendi P, Testillano PS, Mena CG, Muller S, Raska I y Risueño MC** (1998) Histones and DNA ultrastructural distribution in plant cell nucleus: a combination of immunogold and cytochemical methods. *Exp. Cell Res.*, **242**: 45-59.
- **González-Melendi P, Wells B, Beven AF y Shaw PJ** (2001) Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. *Plant J.*, **27**: 223-233.

- **Gotzman J, Eger A, Meissner M, Grimm R, Gerner C, Sauermann G y Folsner R** (1997) *Two-dimensional electrophoresis reveals a nuclear matrix-associated nucleolin complex of a basic isoelectric point*. Electrophoresis, **18**: 2645-2653.
- **Grasser KD, Grill S, Duroux M, Launholt D, Thomsen MS, Nielsen BV, Nielsen HK y Merkle T** (2004) *HMGB6 from Arabidopsis thaliana specifies a novel type of plant chromosomal HMGB protein*. Biochemistry, **43**: 1309-1314.
- **Gray JC** (2003) *Chloroplast-to-nucleus signalling: a role for Mg-protoporphyrin*. Trends Genetics, **19**: 526-529.
- **Hachet V, Kocher T, Wilm M y Mattaj IW** (2004) *Importin alpha associates with membranes and participates in nuclear envelope assembly in vitro*. EMBO J., **23**: 1526-1535.
- **Hand R** (1978) *Eucaryotic DNA: Organization of the genome for replication*. Cell, **15**: 315-325.
- **Harder PA, Silverstein RA y Meier I** (2000) *Conservation of matrix attachment region-binding filament like protein 1 among higher plants*. Plant Physiol., **122**: 225-234.
- **Hatton D y Gray JC** (1999) *Two MAR-DNA binding proteins of the pea nuclear matrix identify a new class of DNA-binding proteins*. Plant J., **18**: 417-429.
- **Hausshalter KA y Kadonaga JT** (2003) *Chromatin assembly by DNA-translocating motors*. Mol. Cell Biol., **4**: 613.
- **Heng HHQ, Goetze S, Ye CJ, Liu G, Stevens JB, Bremer SW, Wykes SM, Bode J y Krawetz SA** (2004) *Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions*. J. Cell Sci., **117**: 999-1008.
- **Herrmann A, Sommer U, Prunada AL, Giese B, Kuster A, Haan S, Becker W, Heinrich PC y Muller-Newen G** (2004) *STAT3 is enriched in nuclear bodies*. J. Cell Sci., **117**: 339-349.
- **Herrmann H y Aebi U** (2001) *Intermediate Filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics*. Curr. Opin. Cell Biol., **12**: 79-90.
- **Herrmann H y Folsner R** (2003) *Intermediate filaments: novel assembly models and exciting new functions for nuclear lamins*. Cell. Mol. Life Sci., **60**: 1607-1612.

- **Heslop-Harrison JS** (2000) *Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes*. Plant Cell, **12**: 617-635.
- **Hock R, Wilde F, Scheer U y Bustin M** (1998) *Dynamic relocation of chromosomal protein HMG-17 in the nucleus is dependent of transcriptional activity*. EMBO J., **17**: 6992-7001.
- **Holmes-Davis R y Comai L** (1998) *Nuclear matrix attachment regions and plant gene expression*. Trends Plant Sci., **3**: 91-97.
- **Houben A, Demidov D, Gemand d, Meister A, Leach CR y Schubert I** (2003) *Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content*. Plant J., **33**: 967-973.
- **Houben A y Schubert I** (2003) *DNA and proteins of plant centromeres*. Curr. Opin. Plant Biol., **6**: 554-560.
- **Iborra F, Cook PR y Jackson DA** (2003) *Applying microscopy to the analysis of nuclear structure and function*. Methods, **29**: 131-141.
- **Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, Izutsu K, Nitta E, Mitani K, Satake M, Noda T, Ito Y y Hirai H** (2004) *The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1*. Mol. Cell. Biol., **24**: 1033-1043.
- **Inagaki M, Matsuoka Y, Tsujimura K, Ando S, Tokui T, Takahashi T e Inagaki N** (1996) *Dynamic property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation*. BioEssays, **18**: 481-487.
- **Irons SL, Evans DE Y Brandizzi F** (2003) *The first 238 amino acids of the human lamin B receptor are targeted to the nuclear envelope in plants*. J. Exp. Bot., **54**: 943-950.
- **Ivanov KI, Puustinen P, Gabrenaite R, Vihinen H, Ronnstrand L, Valmu L, Kalkkinen y Makinen K** (2003) *Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection*. Plant Cell, **15**: 2124-2139.
- **Jackson DA** (2003 a) *The principles of nuclear structure*. Chromosome Res., **11**: 387-401.
- **Jackson DA** (2003 b) *The anatomy of transcription sites*. Curr. Opin. Cell Biol., **15**: 311-317.



- **Jackson DA y Cook PR** (1988) *Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat*. EMBO J., **7**: 3667-3677.
- **Jackson DA y Cook PR** (1995) *The structural basis of nuclear function*. En "Int. Rev. Cytol". Vol, **162A**, pp. 125-149 (R. Berezney. y K. Jeon, eds). San Diego: Academic Press.
- **Jasencakova Z, Meister A y Schubert I** (2001) *Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley*. Chromosoma, **110**: 83-92.
- **Jaunin F y Fakan S** (2002) *DNA replication and nuclear architecture*. J. Cell. Biochem., **85**: 1-9.
- **Jeong SY, Rose A y Meier I** (2003) *MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure*. Nuc. Acid Res., **17**: 5175-5185.
- **Jeong SY, Peffer N y Meier I** (2004) *Phosphorylation by protein kinase CKII modulates DNA-binding activity of a chloroplast nucleoid-associated protein*. Planta, **219**: 298-302.
- **Joaquin M y Watson RJ** (2003) *Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor*. Cell Mol. Life Sci., **60**: 2389-2401.
- **Johnson L, Cao X y Jacobsen S** (2002) *Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation*. Curr. Biol., **12**: 1360-1367.
- **Kamemura K y Hart GW** (2003) *Dynamic interplay between O-glycosilation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription*. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **73**: 107-136.
- **Kandasamy MK, Deal RB, McKinney EC y Meagher RB** (2004) *Plant actin-related proteins*. Trends Plant Sci., **9**: 196-202.
- **Kimura H y Cook PR** (2001) *Kinetics of core histones in living human cells: little exchange oh H3 and H4 and some rapid exchange of H2B*. J. Cell Biol., **153**: 1341-1353.
- **Kimura H, Sugaya K y Cook PR** (2002) *The transcription cycle of RNA polymerase II in living cells*. J. Cell Biol., **159**: 777-782.
- **Kircher S, Gil P, Kozma-Bognar L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adam E, Shafer E y Nagy F** (2002) *Nucleocytoplasmic partitioning of the*

plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell*, **14**: 1541-1555.

- **Kiseleva E, Drummond SP, Goldberg MW, Rutherford SA, Allen TD y Wilson KL** (2004) Actin- and protein 4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Cell Sci.*, **117**: 2481-2490.
- **Kobayashi T, Takahara M, Miyagishima S, Kuroiwa H, Sasaki N, Ohta N, Matsuzaki M y Kuroiwa T** (2002) Detection and localization of chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *Plant Cell*, **14**: 1579-1589.
- **Kohli A, Twyman RM, Abaranches R, Wegel E, Stoger E y Christou P** (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol. Biol.*, **52**: 247-258.
- **Koumandou VL, Nisbert RER, Barbrook AC y Howe CJ** (2004) Dinoflagellate chloroplasts –where have all the genes gone? *Trends Genetics* (en prensa).
- **Krauss SW, Larabell CA, Lockett S, Gascard P, Penman S, Mohandas N y Chasis JA** (1997) Structural protein 4.1 in the nucleus of human cells: dynamics rearrangements during cell division. *J. Cell Biol.*, **137**: 275-289.
- **Krauss SW, Heald R, Lee G, Nunomura W, Grimm JA, Mohandas n y Chasis JA** (2002) Two distinct domains of protein 4.1 critical for assembly of functional nuclei in vitro. *J. Biol. Chem.*, **277**: 44339-44346.
- **Krohn NM, Yanagisawa S y Grasser KD** (2002) Specificity of the stimulatory interaction between chromosomal HMGB proteins and the transcription factor Dof2 and its negative regulation by CK2-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **277**: 32438-32444.
- **Krohn NM, Stemmer C, Fojan P, Grimm R y Grasser KD** (2003) Protein kinase CK2 phosphorylates the high mobility group domain protein SSRP1, inducing the recognition of UV-damaged DNA. *J. Biol. Chem.*, **278**: 12710-12715.
- **Kuhn EJ y Geyer PK** (2003) Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**: 259-265.
- **Kuroiwa T** (1991) The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *Int. Rev. Cytol.*, **128**: 1-62.

- **Kwon C y Chung IK** (2004) *Interaction of an Arabidopsis RNA-binding protein with plant single-stranded telomeric DNA modulates telomerase activity.* J. Cell Biol, (en prensa).
- **Laat W y Grosveld F** (2003) *Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub.* Chromosome Res., **11**: 447-459.
- **Lamond AI y Spector DL** (2003) *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles.* Nature Mol. Cell Biol., **4**: 605-612.
- **Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W y Pikaard CS** (2004) *A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates tRNA gene dosage control and nucleolar dominance.* Mol. Cell, **13**: 599-609.
- **Le Goff P, Le Drean Y Le Peron, Le Jossic-Corcus C, Ainouche A y Michel D** (2004) *Intracellular trafficking of heat shock factor 2.* Exp. Cell Res., **294**: 480-493.
- **Li H y Roux SJ** (1992) *Casein kinase II protein kinase is bound to lamina-matrix and phosphorylates lamin-like protein in isolated pea nuclei.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 8434-8438.
- **Lin C y Shalitin D** (2003) *Cryptochrome structure and signal transduction.* Annu. Rev. Plant Biol., **54**: 469-496.
- **Lusser A** (2002) *Acetylated, methylated, remodelled: chromatin states for gene regulation.* Curr. Opin. Plant Biol., **5**: 437-443.
- **Ma H, Samarabandu J, Devdhar R, Acharya R, Cheng PC, Meng C y Berezney R** (1998) *Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells.* J. Cell Biol., **143**: 1415-1425.
- **Mancini MA, Shan B, Nickerson JA, Penman S y Lee WH** (1994) *The retinoblastoma gene product is a cell cycle dependent, nuclear matrix-associated protein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**: 418-422.
- **Marie D y Brown SC** (1993) *A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species.* Biol. Cell, **78**: 41-51.
- **Martens JH, Verlaan M, Kalkhoven E, Dorsman JC y Zantema A** (2002) *Scaffold/Matrix attachment region elements interact with p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes.* Mol. Cell. Biol., **22**: 2598-2606.

- **Masuda K, Xu ZJ, Takahashi S, Ito A, Ono M, Nomura K e Inoue M** (1997) *Peripheral framework of carrot cell nucleus contains a novel protein predicted to exhibit a long  $\alpha$ -helical domain.* Exp. Cell Res., **232**: 173-181.
- **Masuda K, Haruyama S y Fujino K** (1999) *Assembly and disassembly of the peripheral architecture of the plant cell nucleus during mitosis.* Planta, **210**: 165-167.
- **Mattout-Drubezki A y Gruenbaum Y** (2003) *Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery.* Cell. Mol. Life Sci., **60**: 2053-2063.
- **McKintosh TD, Riha K, Shippen DE** (2002) *Telomeres, telomerase, and stability of the plant genome.* Plant Mol. Biol., **48**: 331-337.
- **McNulty AK y Saunders MJ** (1992) *Purification and immunological detection of pea nuclear intermediate filaments: evidence for plant nuclear lamins.* J. Cell Sci., **103**: 407-414.
- **Medina MA, Moreno Díaz de la Espina, Martín M y Fernández-Gómez ME** (1989) *Interchromatin granules in plant nuclei.* Biol. Cell, **67**: 331-339.
- **Meier I, Phelan T, Grussem W, Spiker S y Schneider D** (1996) *MFP1, a novel plant filament-like protein with affinity for matrix attachment region DNA.* Plant Cell, **8**: 2105-2115.
- **Miccoli L, Biard DS, Frouin I, Harper F, Maga G y Angulo JF** (2003) *Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle regulated manner.* Nuc. Acid Res., **31**: 4162-4175.
- **Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC y Buendía B** (1999) *Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells.* Chromosoma, **108**: 220-234.
- **Mínguez A** (1995) *Investigación de los principales componentes de la matriz nuclear en plantas y eucariotas inferiores.* Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- **Mínguez A y Moreno Díaz de la Espina S** (1993) *Immunological characterization of lamins in the nuclear matrix of onion cells.* J. Cell Sci., **106**: 431-439.

- **Mínguez A y Moreno Díaz de la Espina S** (1996) *In situ* localization of nucleolin in the plant nuclear matrix. *Exp. Cell Res.*, **222**: 171-178.
- **Mirkovitch J, Mirault ME y Laemmli UK** (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: Specific DNA attachment sites of the nuclear scaffold. *Cell*, **39**: 223-232.
- **Misteli T** (2001) Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, **291**: 843-847.
- **Monneron A y Bernhard W** (1969) Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.*, **27**: 266-288.
- **Moir RD, Spann TP, López-Soler RI, Yoon M, Goldman AE, Khuon S y Goldman RD** (2000) The dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle. Relationships between structure and function. *J. Struct. Biol.*, **129**: 324-334.
- **Moreno Díaz de la Espina S** (1995) Nuclear matrix isolated from plants cells. *International Review of Cytology*. (R. Berezney y K. Jeon eds.) Vol. **162**, pp. 75-139. Academic Press, San Diego.
- **Moreno Díaz de la Espina S, Medina A, Mínguez A y Fernández-Gómez ME** (1993) Detection by bismuth staining of highly phosphorylated nucleoproteins in plants. Determination of its specificity by X-ray microanalysis, SDS-PAGE and immunological analysis. *Biol. Cell*, **77**: 297-306.
- **Moreno Díaz de la Espina S, Samaniego R, Yu W y de la Torre C** (2003) Intermediate filament proteins with nuclear functions: NuMA, lamin-like proteins and MFPI. *Cell Biol. Int.*, **27**: 233-235.
- **Moreno Díaz de la Espina S y de la Torre C** (2003) Coiled-coil and intermediate filament-proteins in the plant nucleoskeleton. *The plant cytoskeleton*. (C. Lloyd e Y. Blume eds). NATO Monographies Series.
- **Morisawa G, Han-Yama A, Moda I, Tamai A, Iwabuchi M y Meshi T** (2000) AHM1, a novel type of nuclear matrix-localized, MAR binding protein with a single AT hook and a J domain-homologous region. *Plant Cell*, **12**: 1903-1916.
- **Muchardt C, Reyes JC, Bourachot B, Legouy E y Yaniv M** (1996) The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. *EMBO J.*, **15**: 3394-3402.



- **Nakamura H, Morita T y Sato C** (1986) *Structural organization of replication domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus*. Exp. Cell Res., **165**: 291-297
- **Nakayasu H y Berezney R** (1989) *Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus*. J Cell Biol., **108**: 1-11.
- **Newman JR y Keating AE** (2003) *Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays*. Science, **300**: 2097-2101.
- **Nickerson JA** (2001) *Experimental observations of a nuclear matrix*. J. Cell Sci., **114**: 463-474.
- **Nicoll JB, Gwinn BL, Iwig JS, García PP, Bunn CF y Allison LA** (2003) *Compartment specific phosphorylation of rat thyroid hormone receptor  $\alpha$  regulates nuclear localization and retention*. Mol. Cell. Biol., **205**: 65-77.
- **Novillo F** (1999) *Caracterización de la matriz nucleolar en células vegetales (A. cepa)*. Tesina de Licenciatura. Departamento de Genética de la Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.
- **Olson MO, Hingorani K y Szebeni A** (2002) *Conventional and non conventional roles of the nucleolus*. Int. Rev. Cytol., **219**: 199-266.
- **Otto H, Dreger M, Bengtsson L y Hucho F** (2001) *Identification of tyrosine-phosphorylated proteins associated with the nuclear envelope*. Eur. J. Biochem., **268**: 420-428.
- **Padmakumar VC, Abraham S, Braune S, Noegel AA, Tunggal B, Karakesisoglou I y Korenbaum E** (2004) *Enaptin, a giant-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton*. Exp. Cell. Res., **295**: 330-339.
- **Parada LA, Soliriou S y Mistell T** (2004) *Spatial genome organization*. Exp. Cell Res., **296**: 64-70.
- **Panzer F, Giménez-Abián MI, López-Sáez JF, Gimenez-Martín G, Cuadrado A, Cánovas JL y de la Torre C** (1997) *Competence for nuclear replication and the NOR-chromosomes of Allium cepa L*. Eur. J. Cell Biol., **72**: 9-12.
- **Paul AL y Ferl R** (1999) *Higher-order chromatin structure: looping and molecules*. Plant Mol. Biol., **41**: 713-720.
- **Pederson T** (2000) *Half a century of the "nuclear matrix"*. Mol. Biol. Cell, **11**: 799-805.

- **Pederson T** (2002) *Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions?*. Trends Biochem Sci., **27**: 111-112.
- **Pelayo HR, Lastres P y de la Torre C** (2001) *Replication and G2 checkpoints: their response to caffeine*. Planta, **212**: 444-453.
- **Petersen K, Leah R, Knudsen S y Cameron-Mills V** (2002) *Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequencies and reduce variance of transgene expression in barley*. Plant. Mol. Biol., **49**: 45-58.
- **Pich U y Schubert I** (1998) *Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in Allium cepa*. Chromosome Res., **6**: 315-321.
- **Pilipuk GP, Galigniana MD y Schwartz J** (2003) *Subnuclear localization of C/EBP $\beta$  is regulated by growth hormone and dependent on MAPK*. J. Biol. Chem., **278**: 35668-36677.
- **Probst AV, Fransz PF, Paszkowski J y Scheid OM** (2003) *Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin*. Plant J., **33**: 743-749.
- **Qiao F, Moss A y Kupfer GM** (2001) *Fanconi anemia proteins localize to chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner*. J Biol. Chem., **276**: 23391-23396.
- **Ragoczy T, Telling A, Sawado T, Groudine M y Kosak S** (2003) *A genetic analysis of chromosome territory looping: diverse roles for distant regulatory elements*. Chromosome Res., **11**: 513-525.
- **Reimer T, Weiwad M, Schlierhorn A, Ruecknagel PK, Rahfeld JU, Bayer P y Fischer G** (2003) *Phosphorylation of the N-terminal domain regulates subcellular localization and DNA binding properties of the peptidyl-propyl cis/trans isomerase hPar14*. J. Mol. Biol., **330**: 955-966.
- **Reyes JC** (2001) *PML and COP1, two proteins with much in common*. Trends Biochem. Sci., **26**:18-20.
- **Reyes JC, Muchardt C y Yaniv M** (1997) *Components of the Human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix*. J. Cell Biol., **21**: 263-274.
- **Riera M, Peracchia G, de Nadal E, Arino J y Pages M** (2001 a) *Maize protein kinase CK2: regulation and functionality of three beta regulatory subunits*. Plant J., **25**: 365-374.

- **Riera M, Peracchia G y Pages M** (2001 b) *Distinctive features of plant protein kinase CK2*. Mol. Cell. Biochem., **227**: 119-127.
- **Riera M, Figueras M, López C, Goday A y Pages M** (2004) *Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic responsive protein Rab17 from maize*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (en prensa).
- **Rodríguez P, Pelletier J, Price GB y Zannis-Hadjopoulos M** (2000) *NAP-2 histone chaperone function and phosphorylation state through the cell cycle*. J. Mol. Biol., **298**: 225-238.
- **Rose A, Gindullis F y Meier I** (2003) *A novel alpha-helical protein, specific to and highly conserved in plants, is associated with the nuclear matrix fraction*. J. Exp. Bot., **54**: 1133-1141.
- **Rose A, Manikantan S, Schaegle SJ, Maloy MA, Stahlberg EA y Meier I** (2004 a) *Genome-wide identification of Arabidopsis coiled-coil proteins and establishment of the ARABI-COIL database*. Plant Physiol., **143**: 927-939.
- **Rose A, Patel S y Meier I** (2004 b) *The plant nuclear envelope*. Planta, **218**: 327-336.
- **Samaniego R** (1999) *Caracterización de la proteína MFP1 (MAR Binding Filament-like Protein 1) en Allium cepa*. Tesina de Licenciatura. Departamento de Genética de la Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- **Samaniego R y Moreno Díaz de la Espina** (2000) *Organisation and composition of the plant nuclear matrix. Characterisation and subcellular distribution of a MAR-binding protein: Ac-MFP1*. Cell Biol. Mol. Lett., **5**: 264-266.
- **Samaniego R, Yu W, Meier I y Moreno Díaz de la Espina S** (2001) *Characterization and high-resolution distribution of a matrix attachment region-binding protein (MFP1) in proliferating cells of onion*. Planta, **212**: 536-546.
- **Samaniego R, de la Torre C, Moreno Díaz de la Espina S** (2002) *Dynamics of replication foci and nuclear matrix during S phase in Allium cepa L. cells*. Planta, **215**: 195-204.
- **Sambrock J, Fritsch EF y Maniatis T** (1989) *A laboratory manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.

- **Saredi A, Howard L y Compton DA** (1997) *Phosphorylation regulates the assembly of NuMA in a mammalian mitotic extract.* J. Cell Sci., **110**: 1287-1297.
- **Sato N** (2001) *Was the evolution of plastid genetic machinery discontinuous?* Trends Plant Sci., **6**: 151-155.
- **Seo HS, Yang JY, Ishikawa M, Bolle C, Ballesteros ML y Chua NH** (2003) *LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1.* Nature, **424**: 995-999.
- **Shaw PJ, Abranches R, Paula santos A, Beven AF, Stoger E, Wegel E y Gonzalez-Melendi P** (2002) *The architecture of interphase chromosomes and nucleolar transcription sites in plants.* J. Struct. Biol., **140**: 31-38.
- **Shopland LS, Johnson CV, Byron M, McNeil J y Lawrence JB** (2003) *Clustering of multiple specific genes and gene-rich-R-bands around SC35 domains: evidence for local euchromatic neighbourhoods.* J. Cell Biol., **162**: 981-990.
- **Sleeman JE, Trinkle-Mulcahy L, Prescott AR, Ogg SC y Lamond AI** (2003) *Cajal body proteins SMN and coilin show differential dynamic behaviour in vivo.* J. Cell Sci., **116**: 2039-2050.
- **Sparks CA, Fey EG, Vidair CA y Doxey SJ** (1995) *Phosphorylation of NUMA occurs during nuclear breakdown and not mitotic spindle assembly.* J. Cell Sci., **108**: 3389-3396.
- **Sparvoll E, Levi M y Rossi E** (1994) *Replicon clusters may form structurally stable complexes of chromatin and chromosomes.* J. Cell Sci., **107**: 3097-3103.
- **Spector DL** (2003) *The dynamics of chromosome organization and gene regulation.* Ann. Rev. Biochem., **72**: 573-608.
- **Steen RL, Beullens M, Landsverk HB, Bollen M y Collas P** (2003) *AKAP149 is a novel PPI specifier required to maintain nuclear envelope integrity in G1 phase.* J. Cell Sci., **116**: 2237-2246.
- **Steimer A, Schob H y Grossniklaus U** (2004) *Epigenetic control of plant development: new layers of complexity.* Curr. Opin. Plant Biol., **7**: 11-19.
- **Stein GS, Lian JB, Montecino M, Stein JL, van Wijnen AJ, Javed A, Pratap J, Choi J, Zaidi SK, Gutierrez S, Harrington K, Shen J, Young D y Pockwinse S** (2003 a) *Nuclear microenvironments support physiological control of gene expression.* Chromosome Res., **11**: 527-536.

- **Stein GS, Zaidi SK, Braastad CD, Montecino M, van Wijnen AJ, Choi JY, Stein JL, Lian JB y Javed A** (2003 b) *Functional architecture of the nucleus: organizing the regulatory machinery for gene expression, replication and repair.* Trends Cell Biol., **13**: 584-592.
- **Stemmer C, Schawander A, Bauw G, Fojan P y Grasser KD** (2002) *Protein kinase CK2 differentially phosphorylates maize chromosomal high mobility group B (HMGB) proteins modulating their stability and DNA interactions.* J. Biol. Chem., **277**: 1092-1098.
- **Strelkov SV, Herrmann H y Aebi U** (2003) *Molecular architecture of intermediate filaments.* BioEssays, **25**: 243-251.
- **Stuurman N, Meijne AM, van der Pol AJ, de Long J, van der Driel R y van der Reswoude J** (1990) *The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for common set of matrix proteins.* J. Biol. Chem., **265**: 5460-5465.
- **Sun JM, Chen HY, Moniwa M, Litchfield DW, Seto E y Davie JR** (2002) *The transcriptional repressor Sp3 is associated with CK2-phosphorylated histone deacetylase 2.* J. Biol. Chem., **277**: 35783-35786.
- **Suk K, Lee JY y Kim SH** (1997) *Synergistic stimulation of fibrinogen gelation by casein kinase II and polycations compounds.* Biochem. Mol. Biol. Inter., **42**: 487-495.
- **Szekely L, Jiang WQ, Pokrovskaja K, Wiman KG, Klein G y Ringertz N** (1995) *Reversible nucleolar translocation of Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 and hsp70 proteins after exposure to heat shock or cell density congestion.* J. Gen. Virology, **76**: 2423-2432.
- **Takano M, Koyama Y, Ito H, Onogi H, Hagiwara M Fukurawa K y Horigome T** (2004) *Regulation of binding of lamin B receptor to chromatin by SR protein kinase and cdc2 kinase in Xenopus egg extracts.* J. Biol. Chem., **279**: 13265-13271.
- **Tessadori F, van Driel R y Fransz P** (2004) *Cytogenetics as a tool to study gene regulation.* Trends Plant Sci., **9(3)**: 147-153.
- **Tolstonov GH, Sabasch M y Traub P** (2002) *Cytoplasmic intermediate filaments are stably associated with nuclear matrices and potentially modulate their DNA-binding function.* DNA Cell Biol., **21**: 213-239.
- **Tsai SC y Seto E** (2002) *Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2.* J. Biol. Chem., **277**: 31826-31833.

- **Tu X, Baffa R, Luke S, Prisco M y Baserga R** (2003) Intracellular redistribution of nuclear and nucleolar proteins during differentiation of 32D murine hemopoietic cells. *Exp. Cell Res.*, **288**: 119-130.
- **Tujera N, Reddy MK, Mudgil Y, Yadav BS, Chandok MR y Soporil SK** (2003) Pea DNA Topoisomerase I is phosphorylated and stimulated by casein kinase 2 and protein kinase C. *Plant Physiol.*, **132**: 2108-2115.
- **Tuteja N** (2003) Plant DNA helicases: the long unwinding road. *J. Exp. Bot.*, **54**: 2201-2214.
- **Tuteja N, Beven AF, Shaw PJ y Tuteja R** (2001) A pea homolog of human DNA helicase I is localized within the dense fibrillar component of the nucleolus and stimulated by phosphorylation with CK2 and cdc2 protein kinases. *Plant J.*, **25**: 9-17.
- **Van Driel R y Fransz P** (2004) Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? *Exp. Cell Res.*, **296**: 86-90.
- **Van Driel R, Fransz P y Verschure PJ** (2003) The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J. Cell Sci.*, **116**: 4067-4075.
- **Vermaak D, Ahmad K y Henikoff S** (2003) Maintenance of chromatin states: and open-and-shut case. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**: 266-274.
- **Wang H, Ma LG, Li JM, Zhao HY y Deng XW** (2001) Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*, **294**: 154-158.
- **Wang J, Shiels C, Sasieni P, Wu PJ, Islam SA, Freemont PS y Sheer D** (2004) Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J. Cell Biol.*, **164**: 515-526.
- **Walker DL, Wang D, Jin Y, Rath U, Wang Y, Johansen J y Johansen KM** (2000) Skeletor, a novel chromosomal protein that redistributes during mitosis provides evidence for the formation of a spindle matrix. *J. Cell Biol.*, **151**: 1401-1412.
- **Wasser M y Chia W** (2000) The EAST protein of Drosophila controls an expandable nuclear endoskeleton. *Nature Cell Biol.*, **2**: 268-275.
- **Weger S, Hammer E y Engstler M** (2003) The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification:



characterization of domains for subcellular localization and sumolation. *Exp. Cell Res.*, **290**: 13-27.

- **Weierich C, Brero A, Stein S, von Hase J, Cremer C, Cremer T y Solovei I** (2003) *Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes*. *Chromosome Res.*, **11**: 485-502.
- **Westmark CJ, Ghose R y Huber PW** (2002) *Phosphorylation of Xenopus transcription factor IIIA by an oocyte protein kinase CK2*. *Biochem. J.*, **362**: 375-382.
- **Xu ZJ, Ueda K, Masuda K, Ono M e Inoue M** (2002) *Molecular characterization of a novel protein disulfide isomerase in carrot*. *Gene*, **284**: 225-231.
- **Yen A, Coder D y Varvayanis S** (1997) *Concentration of RB protein in nucleus vs. cytoplasm is stable as phosphorylation of RB changes during the cell cycle and differentiation*. *Eur. J. Cell Biol.*, **72**: 159-165.
- **Yu W y Moreno Díaz de la Espina S** (1999) *The plant nucleoskeleton: ultrastructural organization and identification of NuMA homologues in the nuclear matrix and mitotic spindle of plant cells*. *Exp. Cell Res.*, **246**: 516-526.
- **Yu S, Wang H, Davis y Ahmed K** (2001) *Consequences of CK2 signalling to the nuclear matrix*. *Mol. Cell. Biochem.*, **227**: 67-71.
- **Zhao T, Heyduk T y Eisenberg JC** (2001) *Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity*. *J. Biol. Chem.*, **276**: 9512-9518.

## APÉNDICE A

---

**Tabla 1**

<b>MEDIO DE AISLAMIENTO DE NÚCLEOS (pH 7,8)</b>		
Goma arábica	2%	5 g
Ficoll	1,25%	3,12 g
Dextrano	2,5%	6,25 g
BSA (seroalbúmina)	100µg/ml	0,025 g
EDTA	0,5mM	0,409 g
β-Mercaptoetanol	8mM	0,14 ml
n-Octanol	4mM	0,16 ml
Tris	25mM	0,755 g
Dietil-pirocarbonato	7mM	0,25 ml
Glicerol	30%	75 ml
Agua bidestilada		160 ml (calculado para los 250 ml de volumen final)

Ajustar el pH a 7,8. Se añade PMSF 1mM justo antes de usar.

**Tabla 2**

<b>TAMPÓN DE CITOESQUELETO (CSK)</b>		
PIPES	10mM	1 ml de PIPES 0,5M pH 6,8
KCl	100mM	5 ml de KCl 1M
Sacarosa	300mM	5,13 g
MgCl <sub>2</sub>	23mM	0,150 ml de MgCl <sub>2</sub> 1M
EGTA	1mM	1 ml de EGTA 50mM, pH 8,2
Agua bidestilada		Hasta 50 ml

Se añade antes de usar: 0,5%(v/v) Triton X-100; 20mM DTT; 1,2mM PMSF; Aprotinina 2 µg/ml.

**Tabla 3**

TAMPÓN DE DIGESTIÓN (DB)		
PIPES	10mM pH 6,8	1 ml de PIPES 0,5M, pH 6,8
NaCl	50mM	0,625 ml de NaCl 4M
KCl	50mM	2,5 ml de KCl 1M
Sacarosa	300mM	5,13 g
MgCl	25mM	0,150 ml de MgCl <sub>2</sub> 1M
EGTA	1mM	1 ml de EGTA 50mM, pH 8,2
Agua bidestilada		Hasta 50 ml

Se añade antes de usar: 0,5%(v/v) Triton X-100; 20mM DTT; 1,2mM PMSF; Aprotinina 2 µg/ml.

**Tabla 4**

MEDIO DE LIS	
HEPES/NaOH	5mM pH 7,4
Espermidina	0,25 mM
EDTA / KOH	2mM pH 7,4
KCl	2mM

Se añade justo antes de usar: 0,5%(v/v) Triton X-100; 20mM DTT; 1,2mM PMSF; aprotinina 2 µg/ml.

**Tabla 5**

TAMPÓN DE DISOCIACIÓN 2x		
SDS	4%	2 ml de SDS 10%
Tris HCl	12,5%	0,625 ml de Tris HCl 1M pH 6,8
Glicerol	20%	1 ml de glicerol 100%
β-mercaptoetanol	10%	0,5 ml
Agua bidestilada		Hasta 5 ml
Azul de bromofenol		Mínimo para colorear

Se usó a concentración 2x, a menos que se especifique otra concentración..

**Tabla 6**

<b>AMIDOBBLACK</b>	
Amidoblack	0,1%
Metanol	45%
Ácido acético	10%

**Tabla 7**

<b>SOLUCIÓN DE DESTENIR GELES</b>	
Ácido acético	10%
Metanol	25%

**Tabla 8**

<b>TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 5x</b>		
Tris HCl	125mM	30 g
Glicina	1M	144 g
SDS	5%	10 g
Agua bidestilada		Hasta 2000 ml

*Se usa a concentración 1x.*

**Tabla 9**

<b>TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 2x</b>		
Glicina	400mM	30 g
Tris HCl	100mM	12,14 g
SDS	0,2%	2 g
Metanol	40%	400ml metanol 100% (se añade el último)
Agua bidestilada		Hasta 1000 ml

*Se usa frío y a concentración 1x.*

**Tabla 10**

TAMPÓN DE DISOCIACIÓN PARA IEF		
Urea	8M	24 g
8-mercaptoetanol	2%	1 ml
Pharmalitos pH 3-10	2%	1 ml de Pharmalitos pH 3-10 de Pharmacia
Triton X-100	0,5%	0.25 ml
Azul de bromofenol		Hasta colorear azul
Agua bidestilada		Hasta 50 ml

**Tabla 11**

MEDIO DE REHIDRATACIÓN PARA IEF		
Urea	8M	12 g
Triton X-100	0,5%	0,125 ml
DTT	10mM	0,0375 g
Ácido acético	0.2%	0,050 ml de acético 1M
Orange G		Hasta colorear
Agua bidestilada		Hasta 25 ml

**Tabla 12**

SOLUCIÓN DE EQUILBRADO (2-DE)		
Tris HCl	50mM	10 ml de Tris HCl 1M ph 6,8
Glicerol	30%	60 ml de glicerol 100%
Urea	4M	72 g
SDS	1%	2 g
Azul de Bromofenol		Hasta colorear
Agua bidestilada		Hasta 200ml



**Tabla 13**

<b>MS 10X</b>	
NaCl	8% P/V
KCl	0,2% P/V
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15% P/V
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2%

Se usa a concentración **1x**. A veces con 0,05% Tween-20 (indicado en el protocolo)

**Tabla 14**

<b>FIJADOR DE GELES</b>	
Etanol	20%
Ácido acético	10%

**Tabla 15**

<b>AZUL DE COOMASSIE</b>	
Azul de Coomassie	0,3%
Ácido acético	10%
Metanol	50%

**Tabla 16**

<b>MEDIO TRIS SALINO</b>	
Tris	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM
NaCl	100 mM
Agua bidestilada	

**Tabla 17**

<b>MEDIO DE LISIS</b>
Tris 15 mM
Na <sub>2</sub> EDTA 2 mM
NaCl 20 mM
KCl 80 mM
Agua bidestilada

## APÉNDICE B

**Tabla 1. Anticuerpos primarios:**

ANTICUERPO	Especificidad	Tipo	Ig	Animal	Dilución en inmunoblot	Origen
<b>288</b>	LeMFP1	S	IgG	Conejo	1:500-1000	Meier (OSU, EEUU)
<b>288 Pre</b>		S	-	Conejo	1:500-1000	Meier (OSU, EEUU)
<b>91</b>	AtMFP1	S	IgG	Conejo	1:300-500	Jeong y Meier (OSU, EEUU)
<b>91 Pre</b>		S	-	Conejo	1:300-500	Jeong y Meier (OSU, EEUU)
<b>Y12</b>	Proteínas Sm de <i>splicing</i>	S	IgG	Ratón	1:2 <sup>IF</sup>	Biomarkers
<b>4G3</b>	Proteínas U2B'' de <i>splicing</i>	M	IgG	Ratón	1:50 <sup>IF</sup>	Organon Teknica
<b><math>\alpha</math>-BrdU</b>	BrdU (síntesis ADN)	M	IgG	Ratón	Sin diluir <sup>IF</sup>	Amersham

\* Las concentraciones son orientativas. Se usan 10 veces más concentradas en técnicas de inmunofluorescencia y 50x en técnicas de microscopía electrónica. S: suero. M: anticuerpo monoclonal. IF: concentraciones usadas en inmunofluorescencia. OSU: The Ohio State University, Plant Biotechnology Center.

**Tabla 2. Anticuerpos secundarios:**

<b>ANTICUERPO</b>	<b>Marcador</b>	<b>Dilución</b>	<b>Técnica</b>	<b>Origen</b>
<b><math>\alpha</math>-IgG de conejo</b>	Peroxidasa	1 : 5.000-50.000	Inmunoblot	Amersham
<b><math>\alpha</math>-IgG de ratón</b>	Peroxidasa	1 : 3.000-5000	Inmunoblot	Amersham
<b><math>\alpha</math>-IgG de conejo</b>	A488 (verde)	1:200	IF	Alexa
<b><math>\alpha</math>-IgG de conejo</b>	A546 (rojo)	1:100	IF	Alexa
<b><math>\alpha</math>-IgG de ratón</b>	A488 (verde)	1:200	IF	Alexa
<b><math>\alpha</math>-IgG de ratón</b>	A 546 (rojo)	1:100	IF	Alexa
<b><math>\alpha</math>-IgG de conejo</b>	Oro 10nm	1 : 50-100	ME	Sigma
<b><math>\alpha</math>-IgG de ratón</b>	Oro 10nm	1 : 50-100	ME	Sigma